

Université de Sherbrooke

**INFLUENCE DES HORMONES THYROÏDIENNES
SUR LA DIFFÉRENCIATION NEURONALE**

Par

DANIÈLE LAVERDURE-DUPONT

Programme de Physiologie (Endocrinologie)

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

Octobre 2002



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-86665-3

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-86665-3

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	X
RÉSUMÉ.....	XII
I. INTRODUCTION.....	1
1. Les hormones thyroïdiennes.....	1
1.1. Synthèse et sécrétion.....	1
1.2. Régulation.....	3
2. Mécanisme d'action classique des HT.....	4
3. Les récepteurs aux HT : localisation et ontogénie.....	8
3.1. Vue d'ensemble.....	8
3.2. Système nerveux.....	9
4. Rôles physiologiques des HT.....	11
4.1. Effets systémiques généraux.....	11
4.2. Effets sur le système nerveux.....	13
5. Hormones thyroïdiennes et expression génique.....	15
5.1. Oligodendrocytes.....	17
5.2. Neurones.....	18
5.3. Astrocytes.....	20
5.4. Matrice extracellulaire et protéines d'adhésion homophiliques.....	21

6. Hormones thyroïdiennes et actions non-génomiques.....	22
6.1. Consommation d'oxygène et homéostasie ionique.....	22
6.2. Polymérisation de l'actine et inactivation enzymatique.....	23
6.3. Lamination.....	25
6.4. Polarité neuronale.....	27
6.5. Microtubules et fonctionnalité des MAPs.....	28
6.6. Effecteurs cytoplasmiques.....	30
7. GAP-43, structure et fonctions.....	32
7.1. C-terminus.....	34
7.2. N-terminus.....	36
II. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS GÉNÉRAUX.....	39
III. MODÈLE D'ÉTUDE.....	42
IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	44
1. Cultures cellulaires.....	44
2. Extractions.....	47
2.1. Extraction totale de protéines.....	47
2.2. Fractionnement subcellulaire.....	48
2.3. Extraction des microtubules.....	49
2.4. Extraction des microfilaments.....	50
2.5. Immunoprécipitation.....	51
3. Identification.....	52
3.1. Immunobuvardage de type ``Western``.....	52

3.2. Immunofluorescence.....	54
4. Analyse statistique.....	55
V. RÉSULTATS.....	56
1. Caractérisation des cultures cellulaires.....	56
1.1. Étude des cellules en microscopie de contraste de phase.....	56
1.2. Quantification des microtubules.....	59
1.3. Localisation et expression de GAP-43.....	59
2. Actions rapides des hormones thyroïdiennes.....	64
2.1. Action des HT sur la phosphorylation de GAP-43.....	64
2.2. Action des HT sur la localisation de GAP-43.....	68
3. Interaction de GAP-43 et de l'actine.....	71
VI. DISCUSSION.....	77
1. Caractérisation des cultures cellulaires.....	77
1.1. Adhésion et élongation neuritique.....	77
1.2. Neurones vs cellules gliales.....	78
1.3. Microtubules.....	79
1.4. Hétérogénéité de la réponse cellulaire selon plusieurs paramètres...83	
1.5. GAP-43.....	84
2. Actions rapides des hormones thyroïdiennes.....	86
2.1. Phosphorylation transitoire de GAP-43.....	86
2.2. Translocation rapide de GAP-43.....	88
3. Interaction de GAP-43 et de l'actine.....	91

VII. CONCLUSIONS.....	94
VIII. REMERCIEMENTS.....	97
IX. RÉFÉRENCES.....	99

TABLEAU DE MISE EN PAGE

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure biochimique des principales hormones thyroïdiennes.....	2
Figure 2 : Mécanisme classique de régulation génique positive par les hormones thyroïdiennes.....	7
Figure 3 : Modèle de sensibilité transitoire aux hormones thyroïdiennes des gènes du cerveau lors du développement du système nerveux chez le rat.....	16
Figure 4 : Interactions cellulaires et implication de la matrice extracellulaire dans le cerveau.....	26
Figure 5 : Mécanisme proposé par lequel les hormones thyroïdiennes activent de manière non-génomique la voie de transduction des MAPK, et potentialise l'état antiviral de l'interféron γ	31
Figure 6 : Schéma de la structure primaire de GAP-43 et localisation des principaux domaines d'intérêt et des sites de phosphorylation.....	35

Figure 7 : Apparence morphologique des cultures cellulaires originant de cortex d'embryons de poulet de 10 jours d'embryogénèse.....	57
Figure 8 : Analyse des effets des hormones thyroïdiennes sur la polymérisation des microtubules de neurones d'embryons de poulet E10 en culture.....	60
Figure 9 : Immunofluorescence de cultures neuronales de 2 et 4 jours d'incubation provenant d'embryons de poulet E10.....	62
Figure 10 : Influence des hormones thyroïdiennes sur l'expression de GAP-43 dans des cultures neuronales d'embryons de poulet E10.....	63
Figure 11 : Influence des hormones thyroïdiennes sur la phosphorylation de GAP-43 dans des cultures neuronales d'embryons de poulet E10.....	65
Figure 12 : Phosphorylation de GAP-43 induite en 30 minutes par divers traitements, dans des cultures neuronales de 2 jours provenant d'embryons de poulet E10.....	66
Figure 13 : Influence de 10 nM de T ₄ sur la cinétique de phosphorylation de GAP-43 dans des cultures neuronales de 2 jours provenant d'embryons de poulet E10.....	69

Figure 14 : Influence d'une exposition de 30 minutes et 2 heures aux hormones thyroïdiennes sur la localisation subcellulaire de GAP-43 dans des cultures neuronales de 2 jours d'embryons de poulet E10.....70

Figure 15 : Comarquage en immunofluorescence de GAP-43 et de l'actine filamenteuse dans des cultures neuronales de 2 jours d'embryons de poulet E10.....72

Figure 16 : Coimmunoprécipitation de GAP-43 et de l'actine dans des cultures neuronales d'embryons de poulet E10, suite à un traitement à 10 et 100 nM de T₄ de 24 et 48 heures.....74

Figure 17 : Influence de 10 et 100 nM de T₄ sur la liaison de GAP-43 à l'actine-F dans des cultures neuronales d'embryons de poulet E10.....75

Figure 18 : Influence de 10 et 100 nM de T₄ sur la polymérisation de l'actine dans des cultures neuronales d'embryons de poulet E10.....76

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AdNT	Adenine nucleotide translocase
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
DIT	Diiodotyrosine
E	Nombre de jour d'embryogénèse
EE	Nombre de jour d'embryogénèse équivalent
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAP-43	Growth associated protein
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GNRP	Guanine nucleotide release protein
GS	Glutamine synthase
HT	Hormone thyroïdienne
IGF	Insulin-like growth factor
MAG	Myelin-associated glycoprotein
MBP	Myelin basic protein
MIT	Monoiodotyrosine
N-CAM	Neuronal cellular adhesion molecule
NF	Neurofilament
NGF	Nerve growth factor
NT-3	Neurotropine-3
PBS	Phosphate buffer saline

Pcp-2	Purkinje cell protein-2
PDI	Protein disulfide isomerase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH kinase
PIPK	Phosphatidylinositol phosphate kinase
PLP	Proteolipid protein
PTX	Pertussis toxine
RC3	Neurogranine
RCPG	Récepteur couplé au protéines G
RHT	Récepteur aux hormones thyroïdiennes
RXR	Récepteur de l'acide 9-cis rétinolique
SNC	Système nerveux central
T₃	3,3',5'-Triiodothyronine
T₄	Thyroxine
TR	Récepteur des hormones thyroïdiennes
TRE	Élément de réponse aux hormones thyroïdiennes
TRH	Thyrotropin releasing hormone
TRIC	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
trkA	Récepteur à activité tyrosine kinase du nerve growth factor
TSH	Thyroid stimulating hormone

XI. RÉSUMÉ

Les hormones thyroïdiennes (HT) sont essentielles au développement du système nerveux et influencent plusieurs étapes de la différenciation neuronale. Le mécanisme d'action le mieux caractérisé des HT utilise la régulation transcriptionnelle de certains gènes cibles par la liaison à un récepteur nucléaire. Par ailleurs, de plus en plus d'évidences soulignent l'importance de mécanismes additionnels non-génomiques empruntés par ces hormones. En premier lieu, nous avons voulu vérifier l'action des HT sur la survie et sur l'adhésion initiale des neurones d'embryons de poulet en culture. La thyroxine est plus efficace que la triiodothyronine dans la promotion de l'attachement initial des neurones à une matrice chargée positivement. Par ailleurs, les HT ne semblent pas influencer la croissance de prolongements entre 2 et 4 jours de culture, période à laquelle la migration cellulaire se termine et qu'apparaît une certaine polarisation neuritique. Comme les HT engendrent plusieurs effets sur la réorganisation et sur l'élaboration du cytosquelette d'actine, nous avons en second lieu observé l'effet des HT sur l'expression et la phosphorylation de GAP-43, une protéine associée à l'actine, impliquée dans la dynamique du cône de croissance et dans les contacts homophiliques. Après 24 heures de traitement, les HT augmentent significativement son expression, mais ne modifient pas son état de phosphorylation. Comme certains effets des HT s'établissent rapidement, nous avons ensuite étudié la cinétique de

phosphorylation de GAP-43. La thyroxine augmente la phosphorylation de GAP-43 de manière transitoire après 30 minutes de traitement, et favorise sa translocation vers le cytosquelette membranaire. Suite à cela aucune modification n'a été observée sur l'association de GAP-43 à l'actine ou sur la polymérisation des microfilaments. En somme, les HT semblent favoriser l'adhésion initiale des neurones, et provoquer une phosphorylation transitoire de GAP-43 et sa translocation subséquente au niveau du cytosquelette sous-membranaire. GAP-43 pourrait ainsi représenté un site d'action extra-génomique par lequel les HT influencent la dynamique du cône de croissance et la stabilité des contacts entre cellules.

Différenciation neuronale, hormones thyroïdiennes, GAP-43.

I. INTRODUCTION

1- Les hormones thyroïdiennes

1.1 Synthèse et sécrétion

La thyroïde est une glande endocrine située dans la partie antérieure du cou utilisant l'acide aminé thyrosine comme précurseur à la synthèse des hormones thyroïdiennes (HT). La 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) et la thyroxine (T_4) sont les principales hormones synthétisées par la thyroïde et sont caractérisées par une fonction diphenyléther, contenant trois ou quatre atomes d'iode respectivement (Figure 1). La formation de celles-ci implique l'oxydation d'atomes d'iode et leur incorporation dans une macromolécule glycoprotéique appelée thyroglobuline (Baulieu et Kelly, 1990). En présence de peroxyde d'hydrogène, ces réactions sont catalysées par la peroxydase liée à la membrane des thyrocytes. Le couplage des résidus d'iodothyrosine donne naissance aux précurseurs d'iodothyronines. De grandes quantités de thyroglobuline contenant la T_4 , la T_3 , et les résidus iodothyrosine non-couplés (MIT, DIT) sont emmagasinés dans le colloïde des follicules thyroïdiens. Suite au signal engendré par la thyrotropine (TSH), la thyroglobuline est réabsorbée et lysée dans les thyrocytes. La T_4 et la T_3 ainsi produites sont subséquemment sécrétées dans la circulation sanguine

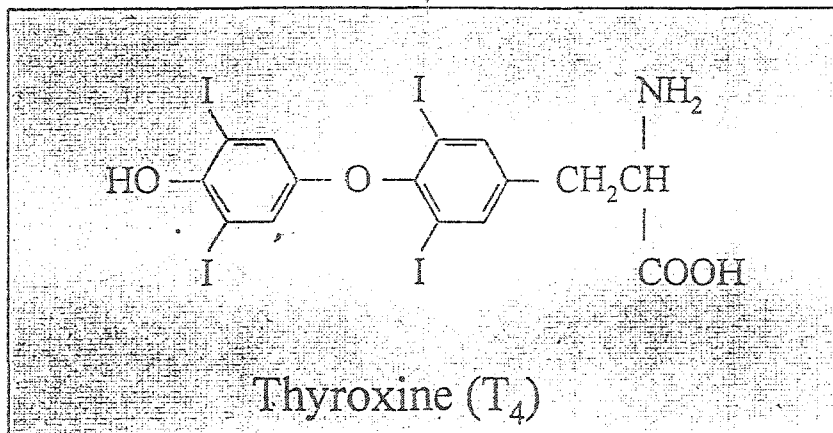
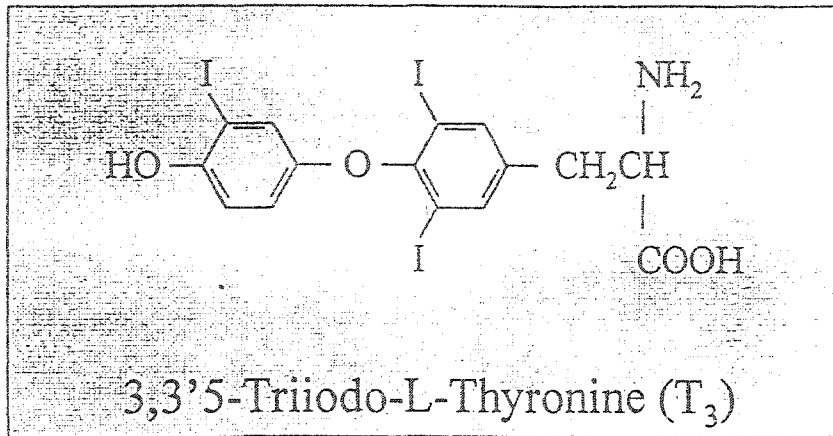


Figure 1 : Structure biochimique des principales hormones thyroïdiennes.

La T_4 représente 90% de la sécrétion totale de la glande thyroïde mais possède dix fois moins d'affinité que la T_3 pour les récepteurs aux hormones thyroïdiennes.

afférente de la glande. Pour leur part, les résidus MIT et DIT formés sont déiodinés à l'intérieur de la thyroïde, et l'iode relâchée s'ajoute à la réserve cellulaire (Baulieu et Kelly, 1990).

Bien que la 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) ne constitue que 9% de la sécrétion hormonale totale de la thyroïde, elle est responsable de la majorité des effets physiologiques attribuables aux HT (Baulieu et Kelly, 1990). Elle dérive majoritairement de la monodéiodination périphérique de la T_4 par la 5'-monodéiodinase (Pallud et al., 1999). La thyroxine (T_4) représente à elle seule 90% des hormones sécrétées par la thyroïde. Comme la demi-vie plasmatique de la T_4 est sept fois supérieure à celle de la T_3 , la thyroxine représente une réserve d'hormone active dont la disponibilité est adaptée aux besoins spécifiques de chaque cible cellulaire et est fonction de l'activité locale de la 5'-monodéiodinase (Greenspan, 2001).

1.2 Régulation

Plusieurs facteurs endogènes peuvent modifier la fonction thyroïdienne. Sa régulation est assurée majoritairement par une hormone glycoprotéique hypophysaire, la thyrotropine (TSH). La liaison de la TSH à son récepteur spécifique situé à la surface externe de la membrane plasmique des thyrocytes amène une augmentation de

la concentration intracellulaire d'AMPc et se traduit par une sécrétion accrue d'HT (Baulieu et Kelly, 1990). Une conséquence majeure à ces effets est de stimuler le transport d'iode à l'intérieur de la glande pour permettre la formation subséquente de précurseurs aux HT. La sécrétion de la TSH par les cellules thyrotropes de l'adénohypophyse est elle aussi régulée. Ces cellules possèdent des récepteurs transmembranaires couplés à des protéines G spécifiques à l'hormone de libération de la thyrotropine (TRH). Leur activation conduit à une augmentation d'AMPc et de calcium intracellulaire, ayant pour effet de permettre la synthèse et la sécrétion de TSH (Baulieu et Kelly, 1990). La TRH provient de la région préoptique de l'hypothalamus et exerce une régulation positive sur la sécrétion de TSH. Au contraire, la somatostatine inhibe la libération de TSH. Ainsi, les niveaux de sécrétion de TSH sont dépendants de plusieurs signaux provenant de l'hypothalamus. De plus, l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien est influencé par la quantité d'HT libre présente dans la circulation périphérique. Ainsi, les HT ont un effet rétro-inhibiteur sur la sécrétion de TSH hypophysaire et de TRH au niveau de l'hypothalamus.

2- Mécanisme d'action classique des HT

Le mécanisme classique selon lequel les HT exerce leurs actions par liaison à des récepteurs nucléaires est largement connu. Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (RHT) sont des facteurs de transcription membres de la superfamille des

récepteurs nucléaires incluant des récepteurs à d'autres petites molécules hydrophobes telles les stéroïdes, la vitamine D, l'acide rétinoïque et les prostaglandines (Munoz et Bernal, 1997). Les RHT sont issus de deux gènes différents désignés $TR\alpha$ et $TR\beta$ localisés sur les chromosomes humains 17 et 3 respectivement. L'épissage alternatif de ces gènes génère plusieurs isoformes. Alors que $TR\alpha1$, $TR\alpha2$ et $TR\alpha3$ originent du gène $TR\alpha$, $TR\beta1$ et $TR\beta2$ sont issus du gène $TR\beta$ (Zhang et Lazar, 2000). Les récepteurs thyroïdiens $\alpha1$, $\beta1$ et $\beta2$ sont des RHT typiques, liant les hormones thyroïdiennes avec une haute affinité et régulant directement l'expression de gènes cibles par liaison aux éléments de réponse aux HT (TRE). Le TRE est constitué d'une répétition de séquences nucléotidiques hexamériques AGGTCA présentes au niveau de l'ADN. Certaines dispositions particulières de deux demi-sites consensus permettent une liaison spécifique et efficace du RHT. Selon l'espacement et l'inversion de ces sites, la liaison de certains RHT sera favorisée, en fonction de leur partenaire de dimérisation. En effet, bien que les RHT puissent agir seuls, les RHT se lient de manière prédominante à l'ADN sous forme d'hétérodimère avec RXR, le récepteur à l'acide rétinoïque (Zhang et Lazar, 2000). $TR\alpha2$ présente également une affinité pour les TRE situé au niveau des promoteurs des gènes cibles, mais ne peut lier les HT. Ainsi, cette protéine peut moduler l'action des HT en compétitionnant pour les sites de liaison sur l'ADN ou pour divers cofacteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle des RHT (Munoz et Bernal, 1997).

Les cofacteurs s'expriment de façon différentielle d'une cellule à l'autre et constituent un moyen additionnel d'assurer la spécificité de la réponse aux hormones thyroïdiennes. Les coactivateurs et les corépresseurs sont des protéines s'associant avec les récepteurs nucléaires de manière ligand-dépendante et capables de modifier leur activité transcriptionnelle (Zhang et Lazar, 2000). Les récepteurs aux HT, contrairement aux récepteurs stéroïdiens, se lient constitutivement aux éléments de réponse sur l'ADN. La liaison de l'hormone au récepteur provoque la libération de corépresseurs et le recrutement de coactivateurs, ce qui augmente le taux de transcription en modifiant la conformation du RHT et son affinité pour la machinerie transcriptionnelle. La liaison des HT peuvent également réguler négativement l'expression de certains gènes comme c'est le cas pour le gène de la thyrotropine hypophysaire (Munoz et Bernal, 1997). Les cofacteurs possèdent un moyen additionnel de régulation de la transcription en agissant sur la structure de la chromatine. L'acétylation des histones du nucléosome permet le relâchement de l'ADN en diminuant la charge positive nette (Zhang et Lazar, 2000). Des activités histone acétyltransférase et déacétylase sont respectivement associées avec les coactivateurs et les corépresseurs (Figure 2).

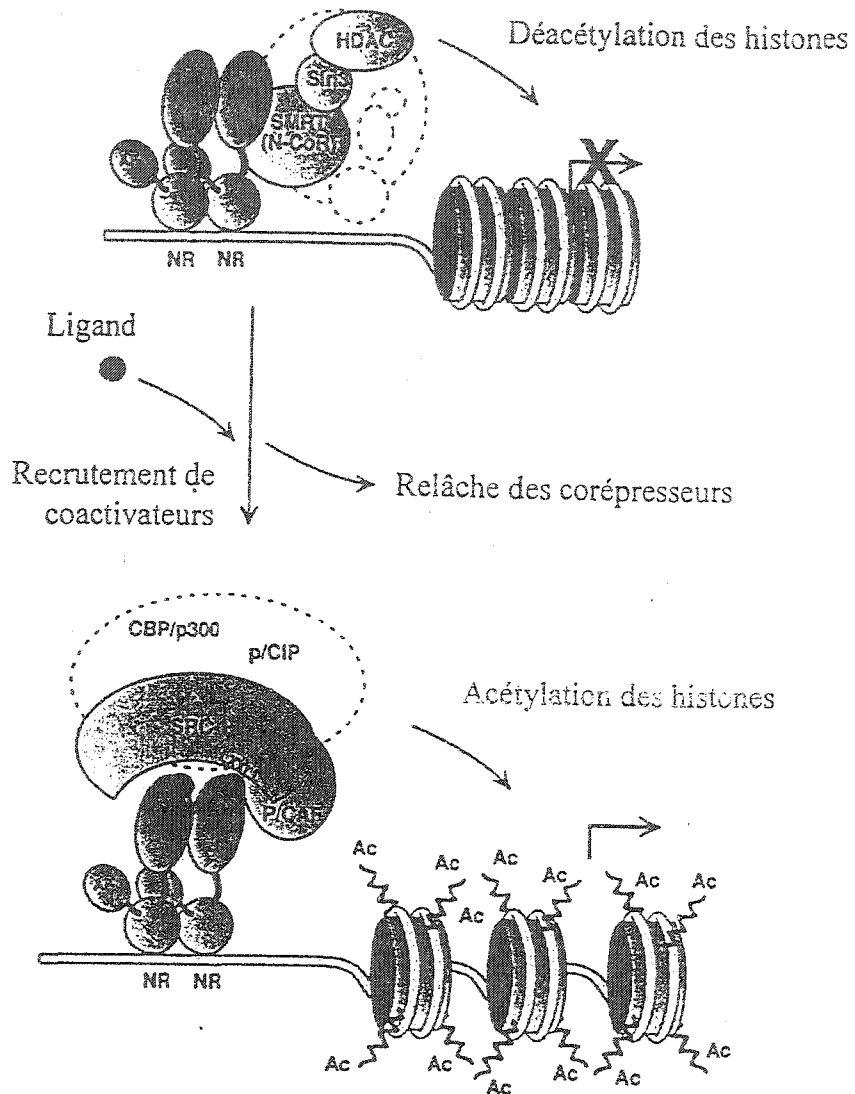


Figure 2 : Mécanisme classique de régulation génique positive par les hormones thyroïdiennes.

En absence de ligand, un complexe de répresseurs inhibe la transcription. Suite à la liaison de l'hormone, les corépresseurs sont relâchés et certains coactivateurs sont recrutés, ce qui permet la transcription génique suite à un remodelage de la chromatine. Tiré et traduit de Robyr et al., 2000.

3- Les récepteurs aux HT : localisation et ontogénie

3.1 Vue d'ensemble

L'expression des récepteurs aux hormones thyroïdiennes, bien qu'ubiquitaire, varie d'un tissu à l'autre. En fait, même si certains organes, comme l'adénohypophyse, le foie, les reins et le cœur répondent de manière importante à une stimulation aux HT, certains autres, en l'occurrence la rate, les testicules et le cerveau adulte, sont relativement insensibles à celles-ci. Ceci est dû en partie à la concentration relative des sites de liaison aux HT présents dans les divers tissus. Ainsi, la concentration des sites de liaison dans les testicules, la rate et le cerveau, ne représente respectivement que 1, 18 et 21% de la capacité de liaison de foie (Oppenheimer et al. 1974).

En plus de la concentration des sites de liaison, la distribution des divers isoformes permet d'expliquer la sensibilité relative de chaque tissu aux HT. Les ARNm du TR β 1 sont distribués de manière très étendue dans tous les tissus majeurs du rat, et représente l'isoforme prédominant du foie (Yen, 2001). Bien que l'isoforme TR β 2 soit fortement concentré au niveau de l'hypophyse, il est responsable de 10 % de la capacité totale de la liaison nucléaire des HT au niveau du cerveau, du foie, du cœur et des reins (Oppenheimer et Schwart, 1997). La protéine α 1 est présente de

manière importante au niveau du cervelet et du cœur, mais aussi dans le foie et les reins (Oppenheimer et Schwart, 1997).

3.2 Système nerveux

La distribution des différents types de récepteurs varie selon la région du cerveau et le stade de développement. Les isoformes TR α 1, TR α 2 et TR β 1 possèdent une distribution tissulaire très étendue, contrairement à l'isoforme β 2, qui présente une expression plus limitée, particulièrement au niveau de la glande hypophysaire (Leonard et al. 1994). Alors que l'isoforme α 1 est détectable dans toutes les régions du cerveau, l'ARNm du récepteur β 1 est exprimé préférentiellement dans la cochlée et le cervelet (Yen, 2001). Le profil d'expression de ces isoformes diffère également selon le stade de développement. Ainsi, TR α 1 et TR α 2 sont abondants durant la période fœtale et immédiatement après la naissance, puis leur expression diminue jusqu'aux niveaux rencontrés chez l'adulte (Yen, 2001). La présence de TR β 1 est pour sa part amplifiée du jour de la parturition jusqu'à l'âge adulte, et cette augmentation est corrélée avec l'apparition de T₃ sérique (Bernal et Nunez, 1995).

Les différents types cellulaires du système nerveux expriment spécifiquement certains isoformes des RHT. De façon globale, la concentration des sites nucléaires de liaison aux HT est beaucoup plus grande dans les neurones que dans les cellules gliales

(Pascual et al. 1986). Alors que le noyau d'un neurone peut contenir plus de 5000 sites de liaison à la T_3 , celui d'un astrocyte n'en contient pas plus de 200 (Leonard et al. 1994). Bien que les neurones semblent exprimer tous les isoformes des récepteurs aux HT, l'isoforme $\beta 1$ est responsable de la majorité de la liaison de T_3 dans les neurones corticaux (Leonard et al. 1994). Chez l'humain, par exemple, un faible marquage immunologique révèle la présence des récepteurs $\alpha 1$ et 2 dans les cellules pyramidales corticales et les cellules de Purkinje du cervelet au premier trimestre gestationnel chez l'humain. Au dernier trimestre, les neurones de ces régions expriment tous les isoformes des RHT (Chan et Kilby, 2000). Au niveau astrocytaire, certaines études révèlent la présence majoritaire de l'isoforme $\alpha 2$ (Leonard et al. 1994), alors que d'autres stipulent que seul le récepteur $\beta 2$ est présent dans les astrocytes de type 1 et peut être responsable de la liaison des HT (Carlson et al. 1996). Pour leur part, les oligodendrocytes matures formant la gaine de myéline autour des cellules du système nerveux central, contiennent tous les isoformes des RHT (Carlson et al. 1996).

4- Rôles physiologiques des HT

4.1 Effets systémiques généraux

Les hormones thyroïdiennes présentent de multiples effets sur divers organes du corps, dont les plus remarquables sont liés à l'augmentation de la consommation d'oxygène et la production de chaleur. Une forte proportion des besoins de l'organisme en oxygène est liée au transport du sodium et du potassium à travers la membrane plasmique. Les HT amplifient de manière importante l'activité de l'enzyme Na^+/K^+ ATPase. La stimulation du métabolisme de base par les HT est sans doute liée à cet effet, d'où origine une utilisation d'ATP et une demande énergétique accrue (Greenspan, 2001).

La triiodothyronine joue un rôle prépondérant dans le développement des fonctions adipeuse et hépatique (Yen, 2001). Le tissu adipeux brun des rongeurs possède une activité de thermorégulation, et celle-ci est fonction de l'expression de la protéine de découplage mitochondriale UCP, dont la synthèse est amplifiée par la T_3 (Yen, 2001). Au niveau du foie, les hormones thyroïdiennes stimulent l'activité de certaines enzymes impliquées dans la synthèse et le métabolisme des lipides, ainsi que dans divers processus oxydatifs (Yen, 2001). Par la régulation génique de divers gènes, les HT influencent plusieurs fonctions hépatiques dont la formation et la

dégradation du cholestérol, la gluconéogenèse, les voies de signalisation de l'insuline et de l'adénylate cyclase, ainsi que la prolifération cellulaire et l'apoptose (Yen, 2001).

Les HT ont également des effets marqués au niveau cardiovasculaire. Elles diminuent la résistance vasculaire, augmente le volume sanguin et possèdent des effets chronotropiques et inotropiques sur la fonction cardiaque (Greenspan, 2001). Ces actions peuvent être dues au contrôle de l'expression de certaines protéines, telles la chaîne lourde de la myosine, divers canaux ioniques et les récepteurs β -adrénergiques (Yen, 2001). Les HT peuvent aussi modifier l'hématocrite du sang en augmentant la production d'érythropoïétine et la concentration de 2,3-diphosphoglycérate des érythrocytes, permettant ainsi une plus grande disponibilité de l'oxygène (Greenspan, 2001).

Au niveau du squelette, les HT sont essentielles à la croissance et au développement normal des os. Les HT, en augmentant directement ou de manière paracrine l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes, favorisent la formation osseuse et la calcification (Greenspan, 2001). En fait, plusieurs études semblent spéculer que les HT participent à la différenciation et à la prolifération des ostéoblastes en régulant la synthèse et l'action de certains facteurs de croissance (Yen, 2001). Dans les muscles, l'effet le plus évident des HT est d'augmenter le taux de relaxation musculaire (Yen, 2001).

4.2 Effets sur le système nerveux

Contrairement à la grande majorité des organes, les HT n'ont virtuellement aucun effet sur le cerveau mature, mis à part la régulation de la synthèse et de la sécrétion de certaines hormones hypophysaires. Au contraire, le développement du système nerveux présente une dépendance majeure à ces hormones. Les hormones thyroïdiennes sont des signaux épigénétiques nécessaires à l'élaboration de circuits neuronaux normaux durant la période critique de différenciation neuronale (Bernal et Nunez, 1995). La nature des anomalies rencontrées en hypothyroïdie souligne l'implication marquée des HT sur l'ensemble des processus de différenciation. Ainsi, il apparaît évident qu'un déficit hormonal entraîne d'importantes conséquences autant sur l'adhésion, la migration et la survie neuronale, que sur la croissance neuritique, la synaptogénèse et la myélinisation (Bernal et Nunez, 1995). En plus de varier d'une région cervicale à l'autre, les stades de différenciation sont spécifiques aux espèces. Chez les espèces précoces, comme le mouton et le poulet, le système nerveux et l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien sont relativement bien développés à la naissance, et l'étude de la différenciation neuronale dans ces modèles s'effectue avant la parturition. À l'inverse, le rat est une espèce tardive, dont l'élaboration définitive de la connectivité du système nerveux s'effectue en période post-natale (Oppenheimer et Schwartz, 1997). L'humain présente des caractéristiques intermédiaires avec un système nerveux peu développé à la naissance et une fonction thyroïdienne mature.

Ainsi, la différenciation neuronale s'effectue préférentiellement au stade embryonnaire des espèces précoces, et en période néonatale chez les espèces tardives.

L'hypothyroïdisme congénitale ou endémique provoque chez l'humain les modifications sévères et permanentes dans l'anatomie et la fonction du système nerveux rencontrées chez les patients atteints de crétinisme. En l'absence d'administration d'hormones exogènes, ces altérations entraînent des retards moteurs et cognitifs, ainsi que l'incapacité à entendre et parler (Nunez et al. 1992). L'examen du cortex cérébral et des cellules de Purkinje du cervelet permet d'identifier les bases anatomiques des anomalies rencontrées. Ainsi, les somas des neurones sont plus petits et rapprochés, la croissance, l'élongation et l'arborisation neuritique est diminuée, et la prolifération et la migration cellulaire est retardée (Chan et Kilby, 2000). De plus, la connectivité cellulaire, l'activité électrique et l'utilisation du glucose dans le cerveau sont altérées, la myélinisation est moindre et l'expression d'enzymes spécifiques tardive (Nunez et al. 1992). Compte tenu de la gravité des effets de l'hypothyroïdisme, certains mécanismes endogènes compensatoires sont mis de l'avant pour tenter de parer aux anomalies du système nerveux. Ainsi, les niveaux de T_3 sont maintenus élevés plus longtemps par une activité accrue de la 5'-déiodinase de type II et une augmentation de l'expression des récepteurs aux HT, ce qui permet, au mieux, de maximiser l'effet des hormones présentes (Chan et Kilby, 2000)

5- Hormones thyroïdiennes et expression génique

Un aspect qui complique l'étude de l'action des HT sur le développement du cerveau réside dans la spécificité spatio-temporelle de la sensibilité des diverses régions cervicales aux HT. La majorité des gènes connus comme étant régulés directement par les HT présentent trois phases de sensibilité à celles-ci. La période réfractaire représente le stade où le gène n'est pas sous le contrôle hormonal. Par la suite, une exposition à la T_3 accélère les taux de transcription des gènes jusqu'au moment où leurs niveaux d'expression deviennent indépendants de la présence d'HT (Oppenheimer et Schwartz, 1997). Un modèle proposé par Oppenheimer et Schwartz (1997), suggère que la présence croissante de gènes supresseurs, dont l'expression est sous le contrôle des HT, peut réprimer la transcription de certains gènes dans le développement tardif. De plus, ce modèle illustre un précepte établi indiquant que même si l'expression de certains gènes est retardée en absence d'HT, leur niveau d'expression atteint éventuellement des niveaux comparables à ceux retrouvés en condition d'euthyroïdie (Figure 3).

Même si peu de gènes régulés directement par les HT ont été identifiés dans le cerveau, certains semblent posséder une fenêtre critique de sensibilité. La difficulté d'isoler ces gènes réside non seulement dans l'identification de la période de sensibilité maximale, mais aussi dans le fait qu'un déficit en HT engendre des effets modestes sur

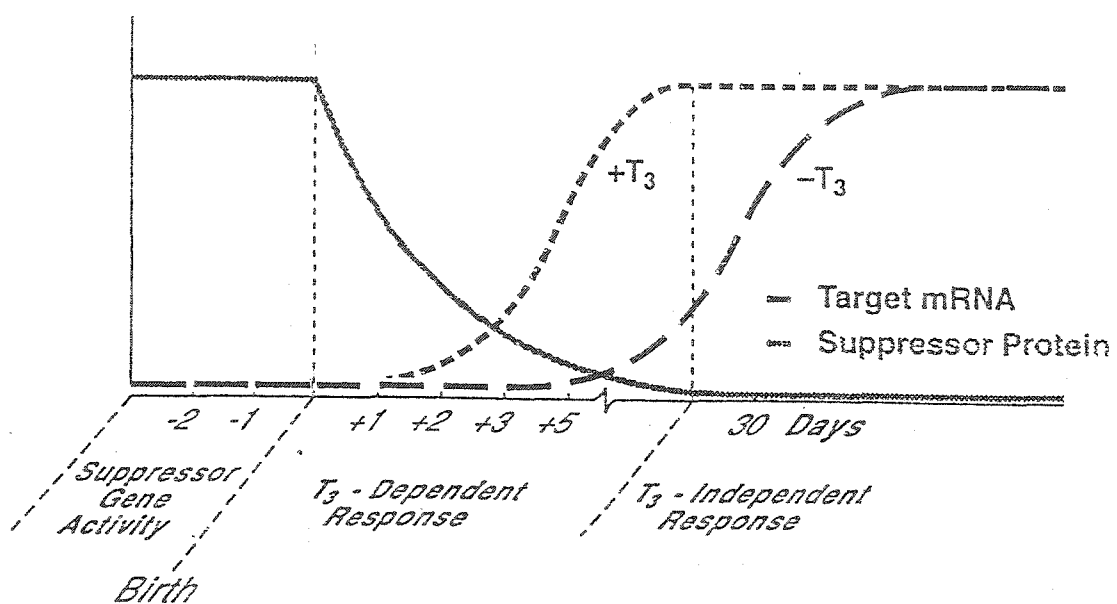


Figure 3 : Modèle de sensibilité transitoire aux hormones thyroïdiennes des gènes du cerveau lors du développement du système nerveux chez le rat.

Pendant la période prénatale, l'expression et la réponse à la T₃ des gènes cibles sont supprimées par la présence de protéines nucléaires. Le déclin de ces protéines favorise l'expression basale en absence d'hormone et sa régulation par la T₃.

la transcription de gènes individuels, probablement parce que ceux-ci sont sous le contrôle simultané de plusieurs facteurs de transcription (Munoz et al., 1991). De plus, les hormones peuvent agir au niveau post-transcriptionnel, en modifiant les taux de translation de l'ARNm ou la demi-vie de la protéine, sans modifier les taux de transcription génique (Bernal et Nunez, 1995).

5.1 Oligodendrocytes

Plusieurs études attribuent un rôle prépondérant aux HT dans la différenciation et la fonction des oligodendrocytes. Les HT, complexées à leurs récepteurs, possèdent la capacité de provoquer l'arrêt de prolifération des cellules précurseurs O2A et d'en induire la différenciation en neutralisant une protéine nucléaire oncogénique (Bernal et Nunez, 1995). De plus, les hormones thyroïdiennes assurent une production normale de myéline. *Myelin basic protein* (MBP), *proteolipid protein* (PLP) et *myelin-associated glycoprotein* (MAG) sont des protéines structurelles majeures de la myéline dont les quantités d'ARNm sont réduites de 50% dans les oligodendrocytes provenant de cerveaux de rats fœtaux hypothyroïdiens (Oppenheimer et Schwartz, 1997). La découverte d'un élément de réponse aux HT dans le promoteur des gènes MBP et PLP, ainsi que la restauration des taux de production normaux suite à une administration hormonale confirment l'implication d'une régulation directe de ces

gènes par les HT (Bernal et Nunez, 1995). De plus, la région promotrice du gène MBP peut lier des facteurs potentiels de suppression, dont la disparition coïncide avec une période de sensibilité aux HT (Chan et Kilby, 2000).

5.2 Neurones

La protéine Pcp-2 (*Purkinje cell protein-2*), la calbindine et le récepteur myo-inositol-triphosphate sont des protéines neuronales qui suivent un profil de sensibilité transitoire aux HT semblable à celui des protéines de la myéline (Oppenheimer et Schwartz, 1997). Chez des rats nouveaux-nés hypothyroïdiens, l'accumulation d'ARNm de ces gènes est significativement retardée, malgré la normalisation éventuelle de leur expression à des niveaux comparables à ceux rencontrés chez des rats euthyroïdiens (Chan et Kilby, 2000). Le gène de la protéine Pcp-2 est exprimé dans les cellules de Purkinje du cervelet et dans les cellules bipolaires de la rétine et contient un élément de réponse au HT dans la région promotrice de son premier intron, ainsi qu'une région de répression à laquelle se lie une nucléoprotéine inhibitrice servant à empêcher une régulation prématurée par les HT (Bernal et Nunez, 1995). Lors d'une carence hormonale, les cellules de Purkinje présentent des anomalies structurales incluant la présence d'irrégularités et d'enroulements le long de l'axone proximal, une modification du calibre de l'axone ainsi qu'une diminution de l'arborisation des épines dendritiques. En plus d'être liées à l'expression de Pcp-2, ces

modifications peuvent être largement attribuables à une diminution de la quantité de protéines du cytosquelette ou de GAP-43 (Figueiredo et al, 1993). GAP-43 ou *growth associated protein* est un marqueur neuronal ayant une implication capitale dans l'établissement des interactions entre cellules et dans la fonction du cône de croissance. Son cas sera élaboré en détail plus loin.

La neurogranine (RC3) et GAP-43 remplissent des fonctions similaires de chaque côté d'une synapse, étant somato-dendritique d'une part, et axonal, de l'autre. Elles sont des substrats de la protéine kinase C et peuvent lier la calmoduline dans leur état déphosphorylé. Ce sont des membres de la famille des calpacitines impliqués dans plusieurs processus de plasticité neuronale, dont la mémorisation et la potentialisation à long terme (Gerendasy et Sutcliffe, 1997). L'étude de cortex cérébraux, de striatums et d'hippocampes provenant de rats hypothyroïdiens révèle une diminution des niveaux d'expression de la neurogranine et de son ARNm de deux à trois fois par rapport aux valeurs retrouvées chez les sujets euthyroïdiens, et ce, chez des rats de tous âges (Oppenheimer et Schwartz, 1997). Bien qu'aucun élément de réponse aux HT n'ait été identifié en amont du gène, le rétablissement rapide des taux normaux d'expression de RC3 suite à une administration hormonale indique une régulation directe du gène par les HT. En fait, contrairement aux gènes étudiés précédemment dont la sensibilité aux HT varie, la concentration finale de la neurogranine est sous l'influence directe des HT de la phase néonatale jusqu'à l'âge adulte (Iniguez et al. 1993).

5.3 Astrocytes

L'expression de certains facteurs de croissance et de leurs récepteurs peut également être modifiée selon la disponibilité des hormones thyroïdiennes. Certaines études révèlent une diminution des ARNm du NGF et de son récepteur trkA dans certaines régions localisées du cerveau hypothyroïdien (Bernal et Nunez, 1995), contrairement à d'autres qui ne montrent pas de modifications significatives (Munoz et al., 1991). Des études plus récentes associent une partie de l'action trophique des HT au contrôle de la synthèse et de la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines par les astrocytes (Koibuchi et Chin, 2000; Gomes et al., 2001). Il semble en effet qu'une administration de T₃ chez des souris adultes conduit à une augmentation de NT-3, de NGF, d'IGF et de BDNF (Gomes et al., 2001). Certains gènes spécifiques aux astrocytes, GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) et GS (*glutamine synthetase*) semblent pour leur part insensibles aux modifications du statut thyroïdien (Oppenheimer et Schwartz, 1997). Or, l'état des connaissances actuelles nous permet de croire que les HT agissent au niveau astrocytaire en empruntant certains mécanismes extra-génomiques. Ceux-ci seront discutés plus loin.

5.4 Matrice extracellulaire et protéines d'adhésion homophiliques

Les composantes de la matrice extracellulaire sont impliquées dans les liaisons hétérophiles des cellules avec leur environnement. La réeline est une protéine de la matrice jouant un rôle crucial dans la migration des cellules granulaires du cervelet. Un déficit en HT provoque une diminution de son expression, ce qui engendre la formation d'agglomérats ectopiques de cellules de Purkinje n'ayant pas migré (Gomes et al., 2001). La N-CAM est une immunoglobine d'adhésion homophile impliquée dans la migration, la différenciation neuronale et la synaptogénèse (Tessier-Lavigne et Goodman, 1996). Elle inhibe la prolifération des cellules progénitrices hippocampiques et favorise leur différenciation en phénotype neuronal (Amoureux et al., 2000). La découverte d'un élément de réponse aux HT dans son intron et la régulation à la hausse de son expression en hypothyroïdie, implique une régulation négative directe des HT sur le gène de la N-CAM (Koibuchi et Chin, 2000). Ainsi, en plus de leurs actions génomiques directes, les HT peuvent agir sur un type cellulaire particulier par l'entremise d'un autre. La multiplicité des contacts entre les cellules et leur environnement engendre une importante interdépendance cellulaire, sur laquelle repose la complexité des effets des HT sur le développement du système nerveux.

6- Hormones thyroïdiennes et actions non-génomiques

6.1 Consommation d'oxygène et homéostasie ionique

Certaines actions induites par les hormones thyroïdiennes sont indépendantes de la transcription génique et apparaissent rapidement, soit entre quelques secondes à quelques heures. Elle n'impliquent pas nécessairement la liaison de l'hormone à un récepteur nucléaire, et sont parfois liées à la stimulation de messagers de différentes voies de transduction (Davis et Davis, 1996). Alors que la T_3 est l'hormone principalement active au niveau transcriptionnelle, la T_4 est l'hormone qui induit les modifications rapides les plus remarquables. Bien que ces actions ont souvent une amplitude de moindre importance que celles produites par un effet génomique, elles peuvent engendrer des répercussions marquées sur la respiration cellulaire, l'homéostasie ionique, le tonus vasculaire, la morphologie cellulaire et la disposition des protéines de surface (Davis et Davis, 1996). En premier lieu, il existe plusieurs étapes sur lesquelles les HT peuvent agir pour augmenter la consommation d'oxygène des mitochondries. Elles peuvent influencer l'AdNT (*adenine nucleotide translocase*) de la membrane mitochondriale interne, et par conséquent l'entrée d'ADP (Sterling, 1986). La cytochrome oxydase représente un autre site d'action potentiel, puisque son activité est rapidement amplifiée de 50% par la présence d'HT (Lanni et al., 1994). En second lieu, le maintien d'un équilibre cellulaire ionique est fonction de la présence

d'HT. Elles prolongent l'inactivation des canaux sodiques de la membrane plasmique des myocardiocytes de rats, stimulent l'activité de la Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique et du réticulum sarcoplasmique de muscles striés et cardiaques, et modifient la cinétique de certains potentiels d'action myocardiques (Huang et al., 1999 ; Rudinger et al., 1984 ; Warnick et al., 1993 ; Sun et al., 2000). Ces effets impliquent souvent une mobilisation de calcium et nécessitent la participation de plusieurs complexes protéiques incluant la calmoduline et la protéine kinase C (Davis et Davis, 1996).

6.2 Polymérisation de l'actine et inactivation enzymatique

La morphologie cellulaire est largement attribuable à l'organisation des divers composantes du cytosquelette. Les microfilaments d'actine sont des structures dynamiques formées par la polymérisation ATP-dépendante de monomères d'actine globulaire. Plusieurs études révèlent une diminution de la proportion d'actine filamenteuse au profit de l'actine monomérique soluble dans les astrocytes en milieu hypothyroïdien, et ce, sans modification des niveaux d'ARNm de la β -actine (Siegrist-Kaiser et al., 1990 ; Leonard et Farwell, 1997). De plus, il a été démontré que le cervelet de rats hypothyroïdiens contient entre 60 et 70% moins d'actine-F, sans variation de la quantité totale d'actine (Faivre-Sarrailh et Rabie, 1988). Une vingtaine de minutes de traitement avec une concentration physiologique de thyroxine (10 nM)

appliquée aux astrocytes en culture, est suffisante pour doubler les niveaux d'actine filamenteuse et engendrer une réorganisation du cytosquelette en structures particulières nommées fibres de stress ou fibres de tension (Farwell et Leonard, 1997). Ces effets ne sont pas freinés par l'application de cycloheximide ou d'actinomycine D, ce qui indique que la transcription directe n'est pas impliquée (Siegrist-Kaiser et al., 1990).

La régulation de la polymérisation de l'actine par les HT entraîne des modifications de l'activité de certaines enzymes membranaires. La 5'-monodéiodinase de type II responsable de la conversion de la T_4 en T_3 , et la PDI (*protein disulfide isomerase*), catalysant la synthèse de protéines possédant des ponts disulfures, sont sujettes à un contrôle qui dépend de l'intégrité du cytosquelette d'actine (Davis et Davis, 1996). Ces enzymes sont inactivées par internalisation vésiculaire et migration vers les endosomes où elles y sont dégradées. La thyroxine initie la cascade d'endocytose conduisant à la translocation de la 5'-déiodinase II de la surface cellulaire, vers l'espace périnucléaire (Leonard et Farwell, 1997). Ainsi, en modifiant les niveaux de polymérisation de l'actine, les HT influencent la morphologie cellulaire et la migration de vésicules endosomales sur le cytosquelette d'actine (Farwell et Leonard, 1997).

6.3 Lamination

L'organisation des microfilaments se répercute aussi sur la disposition de certaines protéines de surfaces, lesquelles ont un rôle à jouer dans la migration neuronale et l'axogénèse. Dans le cerveau, les astrocytes participent à l'élaboration d'une voie de migration neuritique en synthétisant et en sécrétant des composantes de la matrice extracellulaire, et en les fixant en patron spécifique à leur surface (Farwell et al., 1995). La laminine est la composante majeure de la matrice extracellulaire dans le cerveau en développement et sa disposition linéaire présente des repères à la migration neuronale (Clark et al., 1993). Elle interagit avec le cytosquelette d'actine des astrocytes par l'entremise de protéines transmembranaires appelées intégrines. De cette façon, l'organisation des microfilaments astrocytaires influence indirectement le cytosquelette neuronal en modifiant la disposition des intégrines et subséquemment, de la laminine (Figure 4). Plusieurs études menées par Farwell révèlent que la thyroxine module la distribution et l'orientation des intégrines à la surface des astrocytes et favorise leur regroupement en point d'adhésion focaux, et que ces effets sont perturbés par l'application de cytochalasine (Farwell et al., 1995 ; Farwell et Dubord-Tomasetti, 1999). La régulation de l'organisation des microfilaments astrocytaires par les HT est une action rapide non-génomique bien caractérisée. Effectivement, comme les astrocytes expriment en majorité le récepteur dominant négatif TR α 2 rendant les autres isoformes inertes, et comme la T₄ est plus efficace que la T₃ dans l'établissement

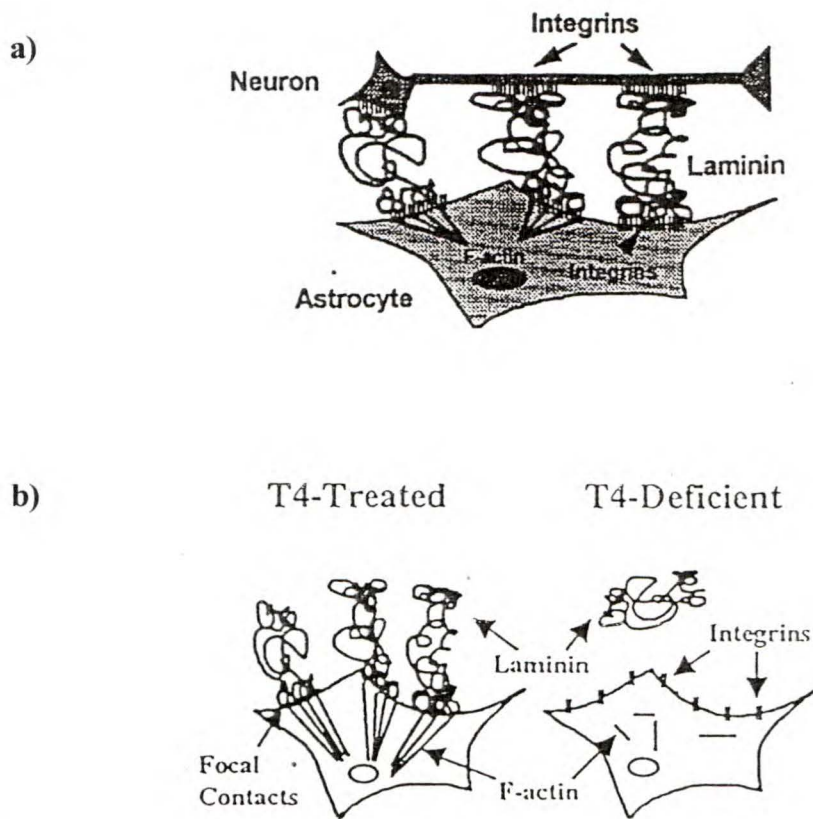


Figure 4 : Interactions cellulaires et implication de la matrice extracellulaire dans le cerveau.

a) Organisation du cytosquelette d'actine, des intégrines et de la laminine dans le cerveau. Tiré de Leonard et Farwell, 1997.

b) Modèle proposé de la régulation par les hormones thyroïdiennes de l'organisation de la laminine à la surface des astrocytes. Tiré de Farwell et Dubord-Tomassetti, 1999.

des modifications observées, une action transcriptionnelle est peu probable (Farwell et Dubord-Tomasetti, 1999). La laminine, présente dans la couche moléculaire du cervelet en développement, est impliquée dans la migration des neurones granulaires de la couche granulaire externe vers la couche interne. L'expression de la laminine dans les cervelets de rats hypothyroïdiens est retardée et diminuée sans modifications apparentes de ses taux de synthèse, ce qui peut s'expliquer par une augmentation de la dégradation par certaines protéases de la matrice extracellulaire (Farwell et Dubord-Tomasetti, 1999b).

6.4 Polarité neuronale

L'établissement de la polarité d'un neurone est une étape cruciale de la différenciation neuronale qui permet de déterminer le devenir fonctionnel de chaque neurite. Ce processus implique la ségrégation de certaines protéines aux compartiments subcellulaires spécifiques à leur fonction, et nécessite souvent la participation conjointe de divers signaux chémotaxiques solubles et de la matrice extracellulaire. La T_3 et la laminine présentent des effets synergiques sur la distribution de certaines protéines de neurones corticaux en culture. Ainsi, en absence d'HT, la distribution de NF-68 et la synapsine, qui sont respectivement des marqueurs de neurofilaments et de synapses, se chevauchent, alors qu'une exposition à la T_3 provoque une redistribution de NF-68 au niveau somatoneuritique et de la synapsine à

l'extrémité distale des prolongements nerveux (Savettieri et al., 1999). La localisation de GAP-43 et de MAP-2, est aussi modifiée par les HT, en passant d'un marquage cellulaire uniforme, jusqu'à une localisation spécifiquement axonale pour GAP-43, et somatodendritique pour MAP-2 (Savettieri et al., 1999).

6.5 Microtubules et fonctionnalité des MAPs

La motilité et la croissance neuritique sont imputables en partie à l'instabilité dynamique des microtubules situés dans la région centrale du cône de croissance, et celle-ci est liée à l'état fonctionnel de plusieurs protéines associées aux microtubules (Gordon-Weeks, 1991). Depuis longtemps, il a été démontré que l'hypothyroïdisme engendre un retard et une diminution de la capacité de la tubuline à se polymériser, en agissant sur l'initiation de l'assemblage (Francon et al., 1977). Bien que l'expression de l'isoforme $\beta 4$ de la tubuline semble diminuer dans le cervelet hypothyroïdien, la majeure partie de l'action des HT sur la stabilité des microtubules est sans doute attribuable à une variation du patron d'expression des MAPs et à l'induction de certaines modifications post-transcriptionnelles (Nunez et al., 1992).

Les MAPs sont des protéines qui, selon l'ampleur de certaines modifications post-transcriptionnelles, stabilisent les microtubules en les liant à diverses composantes du cytosquelette (Laferrière et al., 1997). MAP2 et *tau* sont connues pour promouvoir

l'assemblage de monomères de tubuline et, bien que leur niveau d'ARNm ne semble pas influencé par le statut thyroïdien, leur accumulation est retardée de manière transitoire par un déficit en HT (Silva et Rudas, 1990). L'épissage alternatif de leur transcrit assure la production de formes juvéniles et matures de MAP2 et *tau*, les formes matures présentant une propension supérieure à la polymérisation des microtubules (Nunez et al., 1992). Les HT semblent influencer ces processus, puisqu'en absence d'hormone, le remplacement de la forme juvénile de *tau* par son isoforme mature est différé, ce qui pourrait contribuer à expliquer une croissance axonale moindre (Aniello et al., 1991). La phosphorylation des MAPs est un autre mécanisme extragénomique susceptible de modifier leur affinité pour les microtubules. La phosphorylation de MAP2 par la calcium/calmoduline kinase paraît favoriser l'arborisation dendritique, alors que la phosphorylation de *tau* par la protéine kinase A et C diminue sa liaison à la tubuline, et par conséquent, interfère avec l'élongation axonale (Avila et al., 1994). Comme les HT modifient l'activité de certaines kinases (PKC, PKA, MAPK) impliquées dans la phosphorylation des MAPs, il est probable que ces modifications post-traductionnelles jouent un rôle important dans la différenciation neuronale induite par les HT (Lin et al., 1996 ; Lin et al., 1999).

6.6 Effecteurs cytoplasmiques

De plus en plus d'études démontrent des répercussions directes et rapides des hormones thyroïdiennes sur certains intermédiaires des voies de transduction cytoplasmiques. Dans les cellules HeLa déficientes en RHT, une concentration physiologique de T_4 potentialise l'action anti-virale de l'interféron γ , par un mécanisme indépendant de la transcription, mais qui nécessite l'activation conjointe de la PKA et la PKC (Lin et al., 1996). Plus récemment, il a été observé dans les cellules HeLa et CV-1, que la T_4 induisait rapidement la phosphorylation et la translocation nucléaire de p42 p44 MAPK en absence de cytokines ou de facteurs de croissance, et que cette action impliquait l'activation d'un récepteur membranaire couplé à des protéines G (Lin et al., 1999). Ainsi, suite à la stimulation initiale d'un récepteur membranaire et à la libération de la sous-unité $\beta\gamma$ de G_i , l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a permis de mettre en évidence l'activation séquentielle de PLC, PKC, Raf-1, MEK et MAPK (Lin et al., 1999 ; Figure 5). D'autres études soulignent également l'implication de récepteurs membranaires et l'activation de la cascade MEK-MAPK dans certains effets des HT. La thyroxine peut en effet rapidement induire la phosphorylation d'ERK2 et de TR β 1 cytosolique de manière PKA-dépendante, ce qui provoque leur regroupement et leur translocation au noyau, où ce complexe stimule l'activité transcriptionnelle de STAT1 α et STAT3 (Davis et al., 2000).

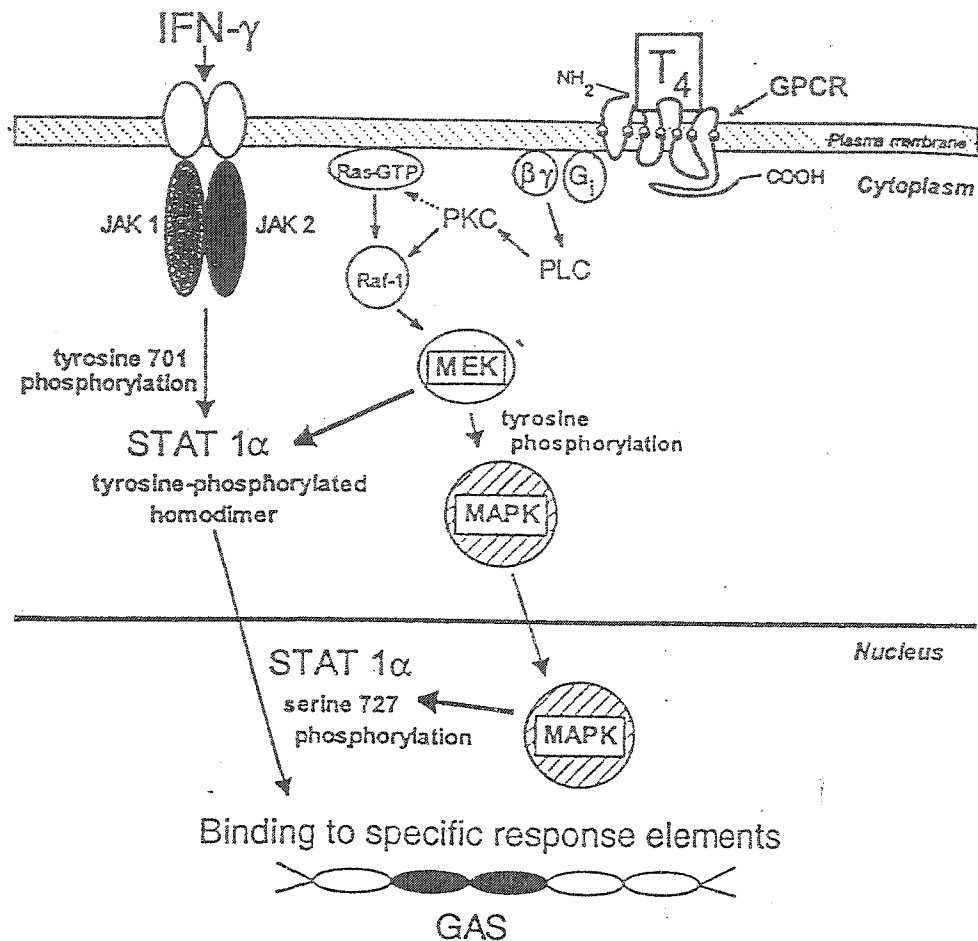


Figure 5 : Mécanisme proposé par lequel les hormones thyroïdiennes activent de manière non-génomique la voie de transduction des MAPK, et potentialise l'état antiviral de l'interféron γ .

La liaison de la T₄ avec un récepteur membranaire couplé à une protéine G_i permet la stimulation de PLC via la sous-unité $\beta\gamma$. L'activation séquentielle des divers intermédiaires cytoplasmiques conduit éventuellement à l'activation de facteurs de transcription STAT1 α . Tiré de Lin et al., 1999.

Finalement, une étude parue dans *Nature* stipule que la liaison des HT à leurs récepteurs cytosoliques peut promouvoir leur association avec la sous-unité régulatrice de la phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K), et son activation subséquente (Simoncini et al., 2000). Cette action pourrait expliquer certains effets des HT sur l'utilisation accrue du glucose par les cellules et sur la stimulation de la survie cellulaire. Des études menées précédemment dans notre laboratoire permettent de faire un lien entre une action membranaire et l'activation d'effecteurs cytoplasmiques. La présence d'un récepteur membranaire aux HT couplé à une protéine Go, dont l'ADP-ribosylation de la sous-unité α est amplifiée par la présence d'hormones, a été démontrée dans des préparations synaptosomales d'embryons de poulet (Giguère et al., 1996). L'ensemble de ces observations indique que l'activité de plusieurs kinases cytosoliques est modifiée par les iodothyronines et que certains des effets extra-génomiques rencontrés peuvent être médiés par des phosphoprotéines (Davis et Davis, 1996).

7- GAP-43, structure et fonctions

GAP-43, *growth-associated protein* ou neuromoduline fut découverte dans les années 80, et parue impliquée dans le développement et la fonction du système nerveux mature. Elle est décrite comme composante majeure de la croissance et du transport axonal dans les projections en régénération et comme phosphoprotéine des

membranes synaptiques du cerveau mature impliquée dans la potentialisation à long terme (Moss et al., 1990). Même si plusieurs évidences mènent à penser que GAP-43 joue un rôle dans l'initiation de la croissance axonale, les niveaux maximum d'expression sont associés avec la phase tardive d'axogénèse et la synaptogénèse précoce (Mahalik et al., 1992). Chez le poulet, alors que le mRNA de GAP-43 apparaît au troisième jour d'embryogénèse, lorsque les neurones terminent leur cycle mitotique et qu'apparaissent les premiers prolongements, son expression est maximale pendant la période de croissance neuritique massive dans toutes les régions du cerveau entre E13 et E15 (Allsopp et Moss, 1989). GAP-43 est localisée exclusivement dans les neurones du système nerveux central et périphérique et représente un des premiers marqueurs neuronaux exprimés dans le système nerveux en développement (Baizer et al., 1990). Il s'agit de la protéine la plus abondante dans les cônes de croissance, où sa concentration est de l'ordre de 100 μ M (Apel et Storm, 1992). Au niveau subcellulaire, plus de 50% du contenu total en GAP-43 se retrouve associé à la face interne de la membrane plasmique des axones ou des terminaisons axonales, alors qu'environ 20% possède une localisation cytoplasmique (Moss et al., 1990).

7.1 C-terminus

L'étude des propriétés biochimiques et structurales de la neuromoduline permet de souligner la présence de certains domaines fonctionnels ayant des répercussions majeures sur la localisation et le rôle de la protéine dans les processus de différenciation (Figure 6). GAP-43 de poulet est formée de 246 acides aminés, soit 20 de plus que celle du rat, et présente un poids moléculaire apparent de 54kDa, contrairement à la protéine de 44kDa du rat (Moss et al., 1990). Elle présente une migration anormale sur électrophorèse, où son poids moléculaire peut varier d'autant que 20kDa en fonction de la proportion d'acrylamide utilisée. Comme aucun site de glycosylation n'est clairement identifié, cette irrégularité est probablement due à l'interférence de l'importante charge native de GAP-43 à la liaison au SDS (Benowitz et al., 1987). La charge globale de GAP-43 est attribuable à la forte proportion d'acides aminés acides qui composent la molécule, et peut expliquer la forme allongée et le peu de structure secondaire de la protéine (Apel et Storm, 1992). Lorsqu'elle est liée à la membrane plasmique par palmytation, GAP-43 peut se présenter sous forme d'homotétramère, ou de complexes multiprotéiques jumelés à la protéine kinase C et à la phosphatidylinositol phosphate kinase (PIPK) (Benowitz et al., 1987). Les multimères ainsi formés sont très hydrophiles et permettent de masquer l'extension C-terminal fortement chargée et connue pour interagir avec le cytosquelette. Cette séquence est localisée à proximité des deux sites de phosphorylation par la caséine

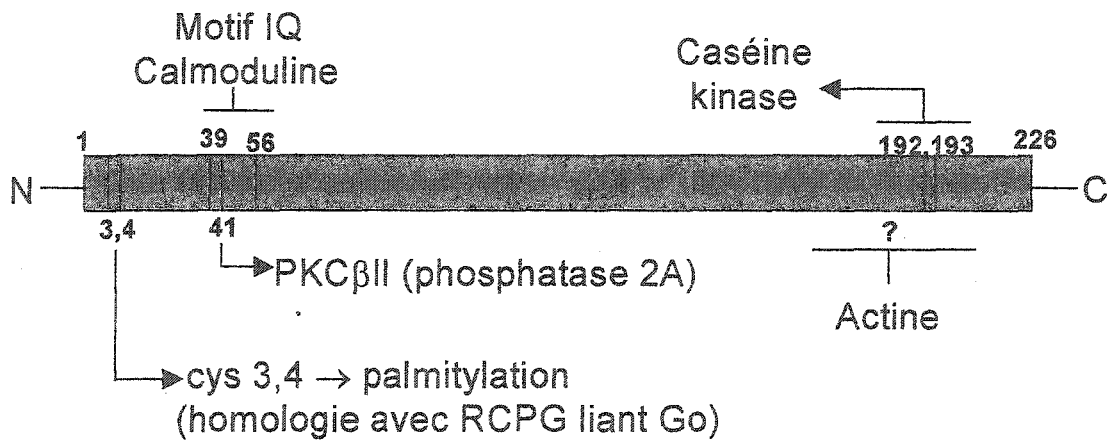


Figure 6 : Shéma de la structure primaire de GAP-43 et localisation des principaux domaines d'intérêt et des sites de phosphorylation.

kinase II, et il est postulé que cette phosphorylation des résidus sérines 192 et 193 peut modifier l'interaction de GAP-43 avec l'actine (Apel et Storm, 1992). La présence d'une telle interaction a entre autre été démontrée *in vitro* dans des préparations purifiées d'actine monomérique (He et *al.*, 1997). De plus, GAP-43 est associée au cytosquelette cortical d'actine adjacent à la membrane plasmique, et cosédimente dans la même fraction subcellulaire que l'actine et certaines protéines des points d'adhésion focaux (Allsopp et Moss, 1989 ; Meiri et Gordon-Weeks, 1990).

7.2 N-terminus

Un prérequis à l'action de GAP-43 est sa liaison à la membrane plasmique par palmytation des résidus cystéines 3 et 4 du N-terminus (Apel et Storm, 1992). Ces sites sont en partie responsables de la translocation axonale de la protéine, mais les 20 premiers acides aminés semblent requis pour son ciblage (Gerendasy et Sutcliffe, 1997). De plus, les sept premiers acides aminés de la protéine présentent une similitude frappante avec les récepteurs transmembranaires liant G_o , laquelle est une protéine majeure non cytosquelettique des membranes des cônes de croissance et des contacts cellulaires (Strittmatter et al., 1994). Puisque GAP-43 peut activer $G_{\alpha o}$ en doublant le taux de libération du GDP, elle fait partie de la famille des GNRP (*guanine nucleotide release protein*) (Strittmatter et al., 1991). G_o peut agir directement sur les canaux calciques et potassiques et sur la voie des phosphoinositols. GAP-43 pourrait

éventuellement modifier la dynamique du cône de croissance et la stabilité des contacts cellulaires, en favorisant l'intégration de signaux taxiques intra et extracellulaires par l'entremise de la protéine G_o (Strittmatter et al., 1990).

La structure de GAP-43 démontre la présence d'un motif IQ liant la calmoduline, entre les acides aminés 29 et 58, ainsi que celle d'un site sérine 41 phosphorylable par la PKC β I et II et déphosphorylable par la phosphatase 2A (Meiri et al., 1996 ; Sheu et al., 1990 ; Dokas, et al., 1991). La phosphorylation du site Ser41 par la PKC entraîne l'incorporation de charges négatives au niveau de motif IQ, ce qui empêche la liaison de la calmoduline. Contrairement à la majorité des protéines qui lient la calmoduline, l'affinité de la calmoduline pour GAP-43 est supérieure en absence de calcium. Une augmentation de calcium intracellulaire favorise donc la libération de la calmoduline, l'activation de PKC et la phosphorylation du site Ser41 (Apel et Storm, 1992). Même si la phosphorylation de GAP-43 n'est pas exclusivement fonction de la concentration calcique interne, le recrutement de la calmoduline, et l'activation de kinases dépendantes du calcium indique que cet ion possède certainement un rôle important dans la régulation fonctionnelle de cette protéine (Heemskerk et al., 1991).

La phosphorylation de la neuromoduline est impliquée dans plusieurs processus lors du développement et chez l'adulte, notamment la croissance axonale, la libération

de neurotransmetteurs et la potentialisation à long terme (Apel et Storm, 1992). Plusieurs études montrent une expression prédominante de la phosphoprotéine aux cônes et aux terminaisons axonales en croissance active, associée avec une accumulation d'actine filamenteuse dans les projections présynaptiques et une modification réversible de la morphologie cellulaire (Dent et Meiri, 1998 ; Rosner et Vacun, 1999). De plus, il a été démontré *in vitro*, que la phosphorylation de GAP-43 favorise la polymérisation des microfilaments, et que sa déphosphorylation défavorise l'assemblage de l'actine en se liant à l'extrémité des filaments pour en prévenir la polymérisation (*barbed end-capping protein*) ou en induisant la production d'actine-ADP (He et al., 1997).

II. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS GÉNÉRAUX

Les études antérieures dans notre laboratoire effectuées par Guoyan Gao se sont attardées à l'élongation neuritique et à l'expression de MAP2 et *tau* dans les neurones d'embryons de poulet après 3 à 9 jours de culture. Comme les HT semblent engendrer des effets au niveau de l'établissement de la polarité neuronale et de la croissance neuritique, nous avons voulu isoler une action sur le développement précoce. Ainsi, nous utilisons des cultures de 1 à 4 jours dans le but d'observer les effets des HT sur la survie et l'adhésion initiale des neurones, phénomènes qui surviennent rapidement après l'inoculation des cellules. GAP-43 est l'un des premiers marqueur neuronal exprimé et impliqué dans l'adhésion et l'établissement de contacts homophiliques. Comme il apparaît que les HT jouent un rôle dans la distribution subcellulaire de la protéine, mais qu'une controverse existe toujours au niveau de sa régulation génique, nous avons voulu clarifier l'effet des HT tant au niveau de son expression qu'au niveau d'éventuelles modifications post-transcriptionnelles.

Les HT favorisent l'induction de la différenciation neuronale en agissant directement sur l'expression génique ou en employant des voies de transduction cytoplasmiques. Les changements morphologiques les plus évidents sont ceux observés sur le cytosquelette d'actine. Bien que plusieurs études aient été faites en condition d'hypothyroïdie sur les microtubules et leurs protéines associées, il est

surprenant de voir la faible quantité de données sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la polymérisation de l'actine et la caractérisation fonctionnelle des protéines pouvant y intervenir. C'est également dans cette optique que GAP-43 nous parait une candidate pertinente à l'étude des modifications du cytosquelette engendrées par des variations de statut thyroïdien. Effectivement, sa forte concentration ainsi que sa localisation subcellulaire suggère fortement une implication dans diverses étapes de la différenciation associées avec les anomalies rencontrées en absence d'HT. De plus, comme l'expression de la neurogranine, l'équivalent dendritique de GAP-43, est directement sous l'emprise des HT, il est concevable de penser à une régulation similaire pour GAP-43, au niveau génique, ou par des modifications post-traductionnelles. Ainsi, il est souvent postulé que les actions extra-génomiques des HT peuvent utiliser des intermédiaires phosphoprotéiques ayant des répercussions sur le cytosquelette ou sur l'activité de protéines G.

Ainsi, les objectifs spécifiques de nos recherches sont les suivants :

- 1- Évaluer l'effet des HT sur le comportement du cytosquelette, en vérifiant les taux de polymérisation des microtubules et de l'actine ;
- 2- Regarder l'expression différentielle du contenu total en GAP-43 dans des cultures euthyroïdiennes et hypothyroïdiennes, pour tenter d'isoler une régulation génique par les HT ;

- 3- Vérifier l'effet d'une exposition aigue aux HT sur la phosphorylation de la neuromoduline et les répercussions possibles de celle-ci sur sa liaison à l'actine et sur sa translocation au niveau du cytosquelette cortical.

Comme certaines études rejettent l'avenue d'une modulation génique de GAP-43, nous spéculons que les HT peuvent exprimer un certain contrôle sur son activité en modulant sa phosphorylation PKC-dépendante, ce qui aurait pour effet de modifier les taux de polymérisation de l'actine, et de croissance neuritique.

III. MODÈLE D'ÉTUDE

Nous utilisons des cultures primaires de cortex d'embryons de poulet de 10 à 11 jours de développement pour l'observation des divers paramètres. Celles-ci sont relativement faciles et peu onéreuses à préparer et présentent des caractéristiques pertinentes à l'étude du développement du système nerveux. Le poulet est une espèce précoce dont la période de différenciation neuronale rapide pendant laquelle les niveaux de tubulines augmentent drastiquement, s'effectue entre 12 et 21 jours d'embryogénèse, (Prati et al., 1992). De plus, comme les récepteurs nucléaires aux HT sont exprimés à partir du 7^e jour de développement, et que l'expression de sites membranaires de liaison aux HT dans des synaptosomes d'embryons de poulet a été démontrée au 9^e jour, ce stade de différenciation correspond à une période de sensibilité aux HT (Prati et al., 1992). L'expression de récepteurs membranaires possédant une affinité, une capacité de liaison, un poids moléculaire et une ontogénie très différente des récepteurs nucléaires classiques aux HT, justifient l'observation d'effets non-génomiques potentiels durant cette période (Giguère et al., 1992). Une autre observation permettant de choisir une période de développement idéale à l'action des HT, réside dans le fait que l'expression maximale de GAP-43 dans le cerveau du poulet est rencontrée au 13^e jour d'embryogénèse, et que durant cette période, elle peut modifier l'activité de la protéine Go des membranes des terminaisons axonales (Baizer et al, 1990 ; Giguère et al., 1996). En terminant, il est aussi important de

mentionner que la fonction thyroïdienne de l'embryon devient active aux environs du 9^e jour de développement et que les cellules recueillies à ce stade sont potentiellement sensibles à une exposition aux HT. Ceci permettrait d'isoler certaines différences relatives au statut hormonal, dans l'initiation de la différenciation neuronale induite par les hormones thyroïdiennes (Prati et al., 1992).

IV. MATÉRIEL ET MÉTHODE

1- Culture cellulaire

Des boîtes de Pétri de 35 mm et de 100 mm préalablement enduites d'une solution de 10 µg/ml de poly-L-lysine (Sigma, Oakville, ON) pendant environ 2 heures sont utilisées pour les cultures neuronales, et reçoivent respectivement 2 ml et 13 ml de milieu Neurobasal (GIBCO, Grand Island, NY) contenant 0,5 mM de glutamine (GIBCO, Grand Island, NY) ainsi que le supplément B27 (GIBCO, Grand Island, NY) dans une proportion de 1:50. Le supplément B27 utilisé est précédemment traité avec une résine échangeuse d'anions AG 1-X8 (BioRad, Mississauga, ON) permettant d'en extraire les hormones thyroïdiennes (Samuels et al., 1979). Le milieu Neurobasal supplémenté de B27 permet de conserver des cultures primaires à des densités inférieures à 100 cellules par mm², avec une faible prolifération des cellules gliales (Brewer et al., 1993). La glutamine pour sa part est utilisée pour favoriser la survie de neurones embryonnaires.

Les embryons de poulet sont recueillis directement de l'oeuf après 10 à 11 jours d'incubation et leurs hémisphères cérébraux sont extraits. Ceux-ci sont dissociés par plusieurs passages dans une pipette sérologique et fractionnés davantage à l'aide d'un treillis métallique de 200 µm d'espacement. La suspension est alors filtrée à

l'aide d'un tamis cellulaire à pores de 40 μm (VWR, Mississauga, ON) et les cellules sont recueillies suite à une centrifugation à 250 g pendant 5 minutes. Le culot est resuspendu dans le même milieu, et la solution cellulaire est déposée pendant 2 heures à 37°C dans des boîtes de Pétri n'ayant pas été préalablement enduites. Cette incubation sur plastique permet l'adhésion différentielle des cellules gliales, alors que les neurones demeurent en suspension (Banker et Kimberly, 1998). Par la suite, les neurones non-adhérés sont récupérés et la viabilité cellulaire est évaluée en mélangeant un aliquote de cette suspension à un volume égal de 0,4% de bleu de Trypan (Sigma, Oakville, ON). Les cellules excluant la teinture sont comptabilisées à l'aide d'un hémocymètre, et sont déposées sur poly-L-lysine à une densité de 50 000 à 60 000 cellules par cm^2 . Bien que les cellules soient inoculées sur plastique ou sur lamelle de verre pour l'immunofluorescence, l'apparence morphologique des cultures est semblable d'une condition à l'autre, probablement à cause de l'homogénéité de la surface de culture assurée par la présence de polylysine. La densité des différentes cultures est toujours environ la même. Finalement le milieu de culture est complété à volume constant, soit 2 ou 13 ml pour les boîtes de Pétri de 35 ou 100 mm, et les cultures sont maintenues à 37°C dans 5% CO_2 . Le même milieu de culture est utilisé tout au long de l'incubation, puisque les cellules ne sont conservées que 4 jours à faible densité (Brewer et al., 1993).

Les cultures neuronales sont traitées quotidiennement, ou selon les indications de chaque expérience, avec 10 nM de T₃ (Sigma, Oakville, ON), 10 ou 100 nM de T₄ (Sigma, Oakville, ON), ou leur tampon physiologique, soit 10 mM Hepes (GIBCO, Grand Island, NY), 40 mM NaOH. L'utilisation de telles concentrations s'explique par plusieurs études qui démontrent une action trophique de concentrations physiologiques entre 10 et 100 nM de T₃ dans des cultures primaires (Walker, 1996). Aussi les études antérieures effectuées par Guoyan Gao démontrent les effets importants d'une administration quotidienne de 10 nM de T₃ dans notre modèle cellulaire. Finalement 100 nM de T₄ est utilisé ponctuellement pour l'étude de la cinétique puisque plusieurs groupes ont observé certaines actions hormonales rapides sur la localisation subcellulaire de protéines associées au cytosquelette et sur la phosphorylation de protéines cytoplasmiques (Savettieri et al., 1999 ; Davis et al., 2000 ; Lin et al., 1999). Certaines cultures sont également incubées en présence de 10 ng/ml de NGF (Sigma, Oakville, ON) dans 0,5% BSA (Sigma, Oakville, ON) dans PBS (10 mM Na₂HPO₄-7H₂O, 2,68 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,764 mM KH₂PO₄, pH 7,4) ou de leur témoin respectif soit 0,5% BSA (Sigma) dans PBS. Certaines cultures sont préincubées pendant 18 heures avec la toxine de Pertussis (Sigma, Oakville, ON) à une concentration de 100 µg/ml dans 2 mg/ml BSA (Sigma) dans de l'eau bidistillée.

2-Extractions

2.1 Extraction totale de protéines

Pour débiter, le milieu de culture est aspiré, et remplacé par 1 mM sodium orthovanadate (Sigma, Oakville, ON), 100 nM staurosporine (Sigma, Oakville, ON) dans PBS, pendant 10 minutes sur glace, dans le but d'inhiber l'activité enzymatique des phosphatases et des kinases. Par la suite, cette solution est retirée et les cellules sont incubées 30 minutes à 4°C avec le tampon de solubilisation suivant : 50 mM Hepes pH 7,8 (GIBCO), 1% Triton (ICN, Aurora, Ohio), 1 mM sodium orthovanadate (Sigma), 100 nM staurosporine (Sigma) et une pastille d'inhibiteurs de protéases «Complete Mini, EDTA free» (Roche Diagnostic, Laval, QC). Finalement, les cellules sont grattées des boîtes de Pétri et sont centrifugées à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est alors recueilli et congelé à -20°C pour analyse ultérieure. Les anticorps monoclonaux utilisés pour l'identification par électrophorèse sont anti-GAP-43 (Sigma, Oakville, ON), anti-actine (Sigma, Oakville, ON) et anti-phospho-(Ser/thr)-Phe (New England Biolabs, Mississauga, ON) dans une proportion de 1:1000.

2.2 Fractionnement subcellulaire

Pour évaluer la composition de divers compartiments cellulaires, la méthode de fractionnement subcellulaire de Tejero-Diez et al. (2000) est utilisée. Après 2 jours de culture, les cellules sont lavées 2 fois avec 1 mM sodium orthovanadate (Sigma) préalablement activé par chauffage en solution basique, 100 nM staurosporine (Sigma) dans PBS, puis sont ensuite extraites dans le tampon d'homogénéisation (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM sodium orthovanadate (Sigma), 100 nM staurosporine (Sigma) avec une pastille d'inhibiteurs de protéases «Complete Mini, EDTA free» (Roche Diagnostic)). La suspension cellulaire est homogénéisée par plusieurs passages à travers une pipette sérologique et centrifugée à 100 000 g pendant 40 minutes à 4°C. Le surnageant récupéré représente la fraction soluble. Le culot est resuspendu dans le même tampon d'homogénéisation contenant 1% de Nonidet P-40 (GIBCO BRL, Burlington, ON), et la solution est centrifugée de nouveau. Les membranes solubilisées sont récupérées au niveau du surnageant, alors que le culot représente la fraction insoluble enrichie en composantes du cytosquelette. Les 3 fractions sont conservées à -20°C pour analyses protéiques subséquentes, avec les anticorps primaires anti-GAP-43 (Sigma) et anti-phospho-(Ser/thr)-Phe (New England Biolabs) à une concentration de 1:750.

2.3 Extraction des microtubules

Les cultures cellulaires sont incubées entre 1 et 4 jours en absence ou en présence de 10 nM de T₃ (Sigma) ou de T₄ (Sigma) renouvelé quotidiennement. La technique utilisée pour extraire les microtubules est basée sur les observations de Solomon (1986) et comporte quelques modifications. Ainsi, les cellules sont incubées avec 1 µM de Taxol (*Paclitaxel*, Sigma, Oakville, ON) dans le milieu de culture à 37°C pendant 2 heures. Par la suite le milieu est remplacé par 1 ml de solution PM2G à 37°C (0,1 M Pipes, 2 M glycérol, 0,005 M MgCl₂, 0,002 M EGTA pH 6,9, inhibiteurs de protéases «Complete Mini, EDTA free» (Roche Diagnostic)) contenant 1 µM de Taxol (Sigma). Un aliquote de cette solution est dilué 1:10 dans du PBS et les cellules sont comptées avec un hémocymètre. L'EGTA, le magnésium et le glycérol augmentent la stabilité des microtubules, alors que le Pipes et l'alcalinité de la solution détruisent la chromatine et les filaments intermédiaires (Solomon, 1986). Les échantillons sont centrifugés à deux fois à 1000 g pendant 5 minutes à 37°C. Après le dernier lavage, le culot est dissout, et les cellules sont lysées dans la même solution contenant 1% de Nonidet P-40 (GIBCO BRL). Les échantillons sont ensuite incubés avec agitation lente pendant 15 minutes à 37°C. Finalement les lysats cellulaires sont centrifugés à 2000 g pendant 5 minutes à 37°C et le culot est resuspendu directement dans le tampon d'échantillon. L'équivalent de 250 000 cellules de chaque échantillon est transféré dans un volume égal et migré sur un gel

de polyacrylamide. L'analyse de type Western avec anticorps anti- β -tubuline (1:1000) (Sigma, Oakville, ON) permet de quantifier la polymérisation des microtubules.

2.4 Extraction des microfilaments

Des préparations enrichies en microfilaments sont obtenues grâce au protocole élaboré par Phillips et al. (1980). Les cellules sont lavées et resuspendues dans 1 mM sodium orthovanadate (Sigma), 100 nM staurosporine (Sigma) dans PBS, et la solution cellulaire est par la suite centrifugée à 100 g pendant 5 minutes à 4°C. Les composantes du cytosquelette sont récupérées en lysant les cellules dans la solution de Triton (0,1 M Tris-HCl pH 7,4, 10 mM EGTA, 1% Triton, 1 mM sodium orthovanadate (Sigma), 100 nM staurosporine (Sigma) avec une pastille d'inhibiteurs de protéases «Complete Mini, EDTA free» (Roche Diagnostic)) pendant 10 minutes à 0°C. Les échantillons sont centrifugés 4 minutes à 8 000 g et le culot ainsi formé est resuspendu directement dans 40 μ l de tampon d'échantillon contenant 2% de SDS (Fisher, Nepean, ON) et 2% de β -mercaptoéthanol (Sigma, Oakville, ON). Avant la migration par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, l'actine est solubilisée par chauffage à 100°C pendant 10 minutes. Un anticorps monoclonal anti-actine (Sigma) est utilisé pour révéler la proportion d'actine filamenteuse recueillie, ainsi que

l'anticorps anti-GAP-43 (Sigma) pour tenter de visualiser la liaison de cette protéine aux microfilaments. Tous deux sont employés à une concentration de 1:750.

2.5 Immunoprécipitation

Les boîtes de Pétri sont lavées avec 1 mM sodium orthovanadate (Sigma), 100 nM staurosporine (Sigma) dans PBS, et les cellules sont resuspendues dans le tampon de lyse contenant 1% de Triton (ICN), 1% BSA (Sigma, Oakville, ON), 1 mM sodium orthovanadate (Sigma), 100 nM staurosporine (Sigma) avec une pastille d'inhibiteurs de protéases «Complete Mini, EDTA free» (Roche Diagnostic), préparé dans le tampon TSA (0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,14 M NaCl, 0,025% NaN₃). Les cellules sont lysées dans cette solution pendant 1 heure à 4°C avec brassage léger, puis centrifugée à 3000 g 5 minutes à 4°C. Le surnageant est conservé et la concentration de protéines est ajustée pour chaque échantillon dans un volume de 100 µl suite au dosage des protéines par la méthode de Bradford. Ce même volume est préclarifié en ajoutant 10 µl de la suspension de protéine A-Sépharose (Sigma, Oakville, ON) pendant 2 heures, afin d'éliminer la liaison non-spécifique aux billes. Cette suspension de protéine A-Sépharose (Sigma) est préparée en diluant 50 mg de billes préalablement lavées dans du PBS. Le lysat cellulaire est centrifugé à 200 g 1 minute pour éliminer les billes, et 10 µl du surnageant est dilué avec 90 µl de tampon de dilution (0,1% Triton (ICN), 0,1% BSA (Sigma) dans le tampon TSA). À chaque

échantillon de lysat cellulaire est ajouté 4 µl d'anticorps polyclonaux anti-actine (Sigma, Oakville, ON) et ces solutions sont incubées toute la nuit à 4°C avec agitation légère. Par la suite, les échantillons sont incubés avec agitation constante pendant 4 heures à température de la pièce avec 10 µl de la suspension de protéine A-Sépharose. Les billes sont lavées successivement 5 fois en culotant les complexes antigéniques entre chaque lavage par centrifugation à 200 g pendant 1 minute. Ainsi, les 2 premiers lavages sont effectués dans le tampon de dilution, le troisième dans la solution TSA, le quatrième dans 0,05 M Tris-HCl pH 6,8, et le dernier dans du TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5). Le culot recueilli est resuspendu dans 20 µl de tampon d'échantillon, chauffé à 100°C pendant 10 minutes, vortexé, et centrifugé pour précipiter les billes. Un volume équivalent du surnageant de chaque échantillon est déposé et migré sur un gel de polyacrylamide, suite à quoi un immunoblot est effectué avec les anticorps monoclonaux anti-actine (Sigma) et anti-GAP-43 (Sigma) dans une proportion de 1:500.

3-Identification

3.1 Immunobuvardage de type «Western»

Suite à la normalisation du contenu protéique de chaque échantillon par la méthode de Bradford, les diverses protéines sont séparées sur un gel dénaturant SDS-

PAGE de 10% polyacrylamide. Les polypeptides sont transférés sur une membrane de polyvinylidene difluoride (Roche Diagnostic, Laval, Qc) préalablement activée dans du méthanol. La membrane est rincée 10 minutes dans la solution de lavage (0,05% Tween-20 (BioRad, Mississauga, ON) dans TBS), et par la suite incubée 1 heure avec agitation dans la solution de blocage (1% gélatine (Fischer, Nepean, ON) dans TBS-Tween-20). La membrane est exposée pendant 2 heures au premier anticorps dilué dans la solution de blocage selon les concentrations mentionnées précédemment, et 3 lavages avec du TBS-Tween-20 suivent. Le deuxième anticorps, soit un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Sigma, Oakville, ON) ou un anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Sigma, Oakville, ON) sont aussi utilisés dans la solution de blocage, dans une proportion de 1:2000. Après 1 heure d'exposition, au moins 4 lavages sont faits et la révélation s'effectue par chemiluminescence grâce à une réaction enzymatique entre la peroxydase et son substrat contenu dans l'ensemble *BM Chemiluminescence Blotting Substrat (POD)* (Roche Diagnostic, Laval, QC). Finalement les membranes sont exposées à un film BioMax (Kodak, Rochester, NY) et l'intensité relative des bandes est évaluée par densitométrie. La quantification de l'intensité des bandes s'effectue par un système informatique lié à un densitomètre qui normalise l'intensité de chaque échantillon selon le bruit de fond du film.

3.2 Immunofluorescence

Pour la visualisation des protéines d'intérêt en immunofluorescence, environ 60 000 cellules sont cultivées sur lamelles de verre de 25 mm. Le milieu de culture est aspiré et les cellules sont lavées avec du PBS à 4°C. Elles sont fixées avec 3% formaldéhyde (Fisher, Nepean, ON) dans la solution PEM (80 mM Pipes, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, pH 6,5) pendant 1 minute et sont successivement exposées à 3% formaldéhyde (Fisher) dans 100 mM sodium borate pH 11 (Fisher, Nepean, ON) pendant 8 minutes, lavées 2 fois durant 5 minutes avec du PBS, et incubées 2 fois 15 minutes avec 0,1% sodium borohydrure (Sigma, Oakville, ON) dans PBS pH 8. Les cellules sont alors perméabilisées par 2 expositions de 5 minutes à 0,2% Triton (ICN) dans PBS. Les liaisons non-spécifiques sont éliminées grâce à une solution de blocage (0,5% BSA (Sigma) dans PBS). Le premier anticorps, soit anti-GAP-43 (Sigma), anti-GFAP (Sigma) ou anti-NE (Sigma), est utilisé dans une proportion de 1:40 dans la solution de blocage pendant 1 heure à température de la pièce. Les cellules sont de nouveau exposées 30 minutes à la solution de blocage et lavées 3 fois avec du PBS. Le deuxième anticorps, l'anti-IgG de souris couplé au *fluorescein isothiocyanate* (FITC) (1:30) (Sigma, Oakville, ON) ou l'anti-IgG de lapin couplé au *tetramethylrhodamine isothiocyanate* (TRIC) (1:20) (Sigma, Oakville, ON), est dilué dans la solution de blocage et appliqué aux lamelles durant 1 heure à température de la pièce. Certaines boîtes de Pétri sont traitées à la phalloïdine (1:60) (Molecular Probes, Eugene, OR), lequel possède une forte affinité pour l'actine filamenteuse et

est couplé directement à un fluorophore. Finalement, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS, et les lamelles sont montées sur des lames de verres avec une goutte de solution à base de glycérol. Elle contient du 1,4-diazabicyclooctane (DABCO), qui ralentit la dispersion de la fluorescence (photobleaching) (*SlowFade Antifade Kit*, Molecular Probes, Eugene, OR).

4-Analyse statistique

Les résultats représentent la moyenne de plusieurs expériences \pm la déviation standard. L'analyse statistique est effectuée selon le test de Student (test de t).

V. RÉSULTATS

1- Caractérisation des cultures cellulaires

1.1 Étude des cellules en microscopie de contraste de phase

Les cultures cellulaires sont observées périodiquement à un grossissement de 40x suite à divers traitements aux hormones thyroïdiennes. Les mêmes boîtes de Pétri, exposées quotidiennement au tampon, à 10 nM de T₃ ou à 10 nM de T₄, sont photographiées après 1 à 4 jours d'incubation. Les figures 7a-b-c présentent l'apparence morphologique des cellules après 24 heures d'exposition au témoin, à 10 nM de T₃ et à 10 nM de T₄ respectivement. Visuellement, un traitement de 24 heures aux hormones thyroïdiennes semble amplifier la présence d'élongations neuritiques en comparaison au témoin. La présence de débris cellulaires, engendrés lors de l'homogénéisation mécanique, est évidente sur ces images, mais ceux-ci disparaissent progressivement dans les jours d'incubation suivants. À la deuxième journée d'exposition (figures 7d-e-f), les cellules traitées à 10 nM de T₄ paraissent également posséder sensiblement plus de neurites que les cellules contrôle. Par contre, dans les jours subséquents, soit à la 3^e (figures 7g-h-i) et 4^e journée (figures 7j-k-l), les différences morphologiques s'estompent et il est difficile de discerner des modifications en fonction de la présence ou de l'absence d'hormones. Comme les

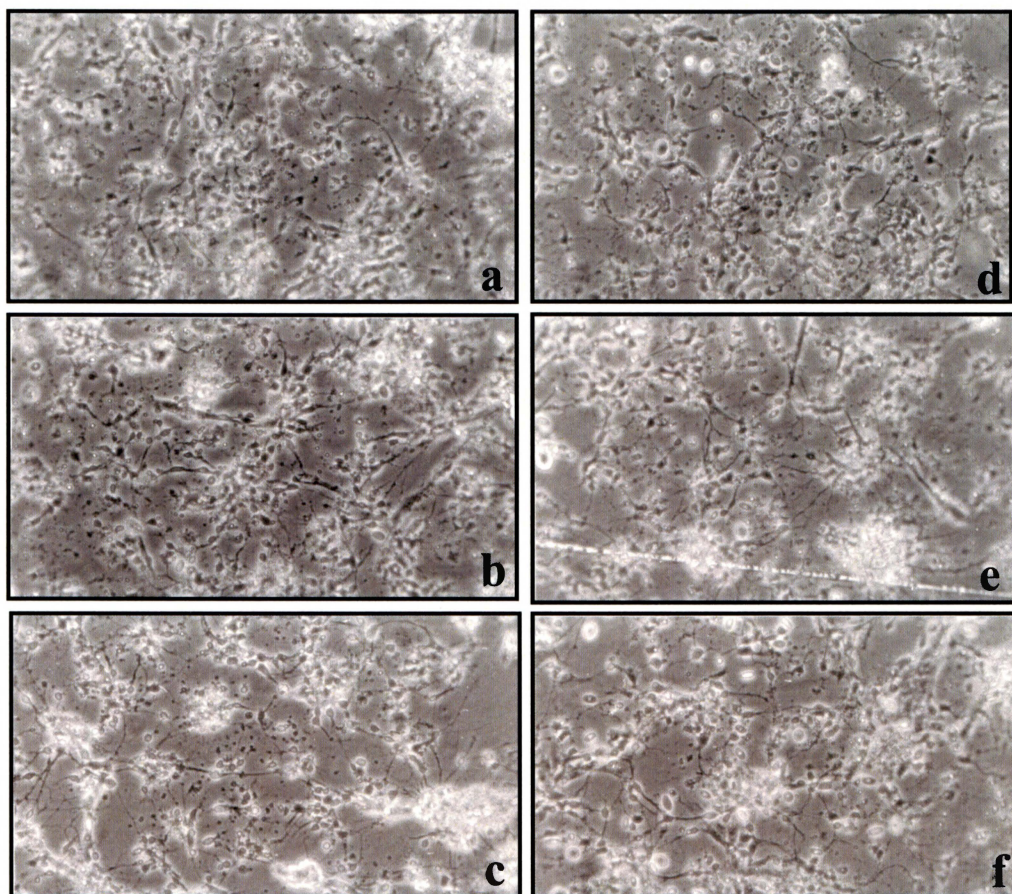


Figure 7: Apparence morphologique des cultures cellulaires originant de cortex d'embryons de poulet de 10 jours d'embryogénèse.

a) 1 jour, contrôle. b) 1 jour, 10 nM T₃. c) 1 jour, 10 nM T₄.
 d) 2 jours, contrôle. e) 2 jours, 10 nM T₃. f) 2 jours, 10 nM T₄.
 g) 3 jours, contrôle. h) 3 jours, 10 nM T₃. i) 3 jours, 10 nM T₄.
 j) 4 jours, contrôle. k) 4 jours, 10 nM T₃. l) 4 jours, 10 nM T₄.

Grossissement: 40x.

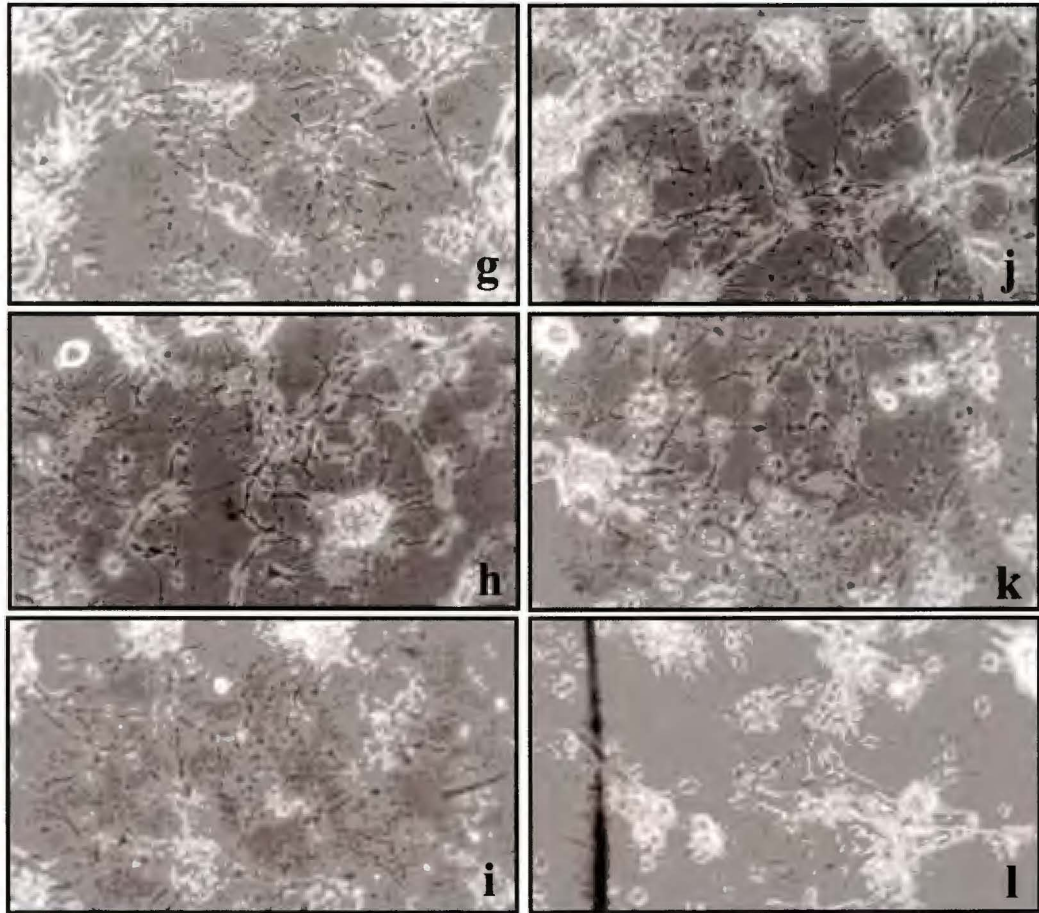


Figure 7: Apparence morphologique, suite

différences morphologiques illustrées par ces figures sont subtiles, nous avons par la suite quantifier l'élongation neuritique en fonction d'un marqueur neuronal.

1.2. Quantification des microtubules

Dans le but de confirmer ces appréciations morphologiques, les microtubules polymérisés sont extraits et représentent une bonne indication de la neuritogénèse. Ainsi la quantité de microtubules des cellules traitées est exprimée en fonction de celle présente dans les cellules en condition contrôle. La figure 8 présente les résultats obtenus suite à 4 jours de traitements quotidiens à 10 nM de T₃ et 10 nM de T₄. La présence de microtubules est $2,7 \pm 0,5$ fois ($n=4$, $p \leq 0,05$) plus élevée après un traitement de 24 heures à 10 nM de T₄, et $1,2 \pm 0,16$ ($n=7$, $p \leq 0,02$) fois supérieure après 48 heures d'exposition. Ces différences disparaissent dans les jours subséquents de traitement, alors que l'étendue des neurites des cellules traitées n'est pas significativement différente de celle en situation contrôle. Les échantillons sont normalisés pour contenir chacun 250 000 cellules par puit.

1.3. Localisation et expression de GAP-43

Dans le but d'évaluer la proportion de cellules neuronales par rapport aux cellules gliales, nous avons effectué une série d'études d'immunofluorescence

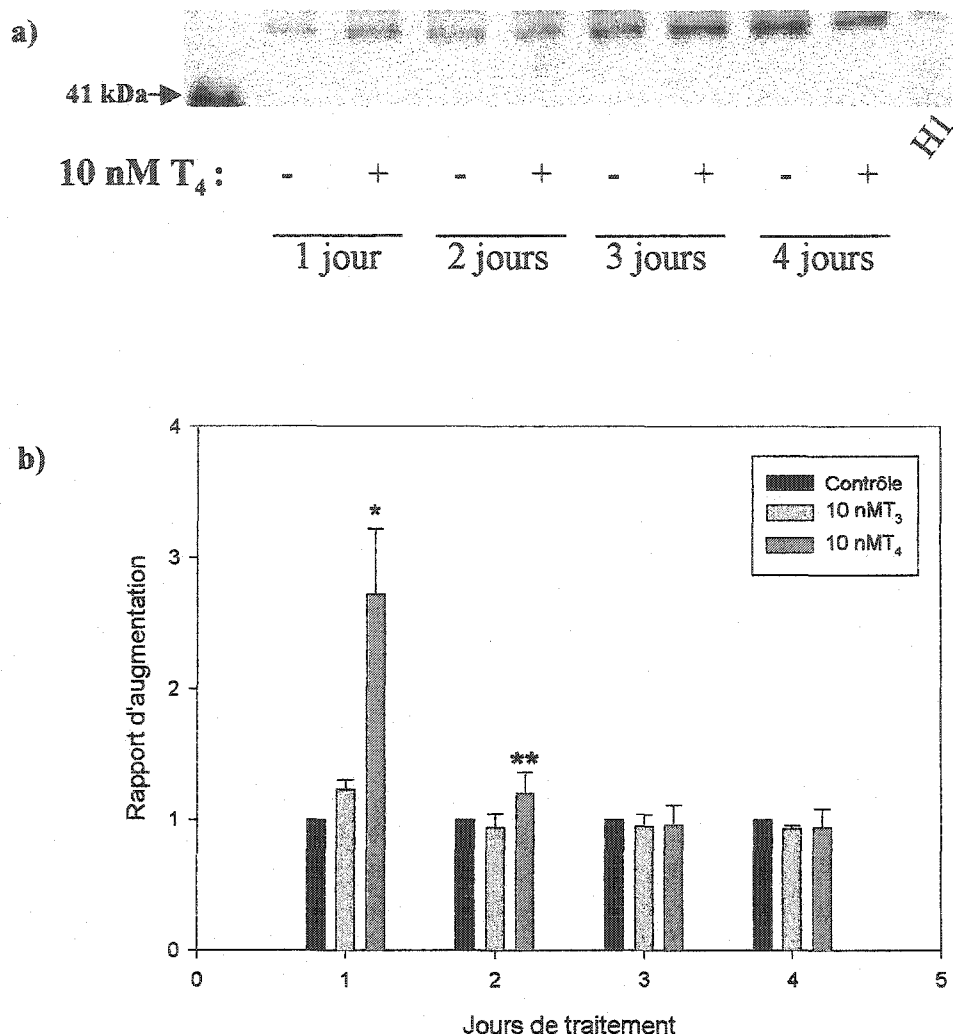


Figure 8: Analyse des effets des hormones thyroïdiennes sur la polymérisation des microtubules de neurones d'embryons de poulet E10 en culture.

a) Western représentatif de l'effet de 10 nM de T₄ sur la polymérisation des microtubules. La quantité d'échantillon est ajusté pour contenir 250 000 cellules par échantillon.

H1: homogénat de cortex d'embryons de poulet E14.

b) Un traitement quotidien de 10 nM de T₄ augmente la polymérisation des microtubules de $172 \pm 50\%$ après 1 jour, et de $20 \pm 16\%$ après 2 jours, relativement aux cultures exposées au tampon physiologique seul.

*, $p \leq 0,05$, **, $p \leq 0,02$.

T₃: n=3, T₄: n=7 sauf jour 1 n=4.

indirecte. Une incubation avec l'anticorps anti-GAP-43 suivi d'une exposition au FITC montre un fort marquage après 2 et 4 jours de culture, à des grossissements différents (figure 9b-e). La figure 9c présente un marquage immunologique dirigé contre les neurofilaments, lesquels sont présents uniquement au niveau neuronal. Malgré l'abondance relative des cellules neuronales assurée par adhésion différentielle, la présence de cellules astrocytaires est observable après 2 et 4 jours de culture grâce à une immunoréactivité de l'anticorps anti-GFAP suivi d'un deuxième anticorps couplé à la rhodamine (figure 9d-f).

Les cellules non-neuronales sont déficientes de GAP-43 et cette protéine représente l'un des premiers marqueurs exprimé dans les neurones. Comme elle possède un rôle majeur dans la croissance axonal, nous avons voulu vérifier si une exposition aux hormones thyroïdiennes en favorisait l'expression. Après 24 heures de traitement, 10 nM de T_3 induit une augmentation de $20,3 \pm 7,9\%$ ($n=4$) par rapport au témoin, et 10 nM de T_4 amplifie la présence de la protéine de $67,3 \pm 50\%$ ($n=6$) (figure 10). Ces différences avec le contrôle sont significatives avec $p \leq 0,02$. Cette différence disparaît après jours 2 et 3 d'exposition aux hormones, et une diminution de l'expression de GAP-43 est observable après 4 jours d'incubation. En effet, 4 jours de traitement à 10 nM de T_3 , diminue l'expression de GAP-43 à $31 \pm 12,2\%$ ($n=3$), alors que 10 nM de T_4 diminue son expression à $67,5 \pm 29\%$ ($n=6$) du contrôle. Ces

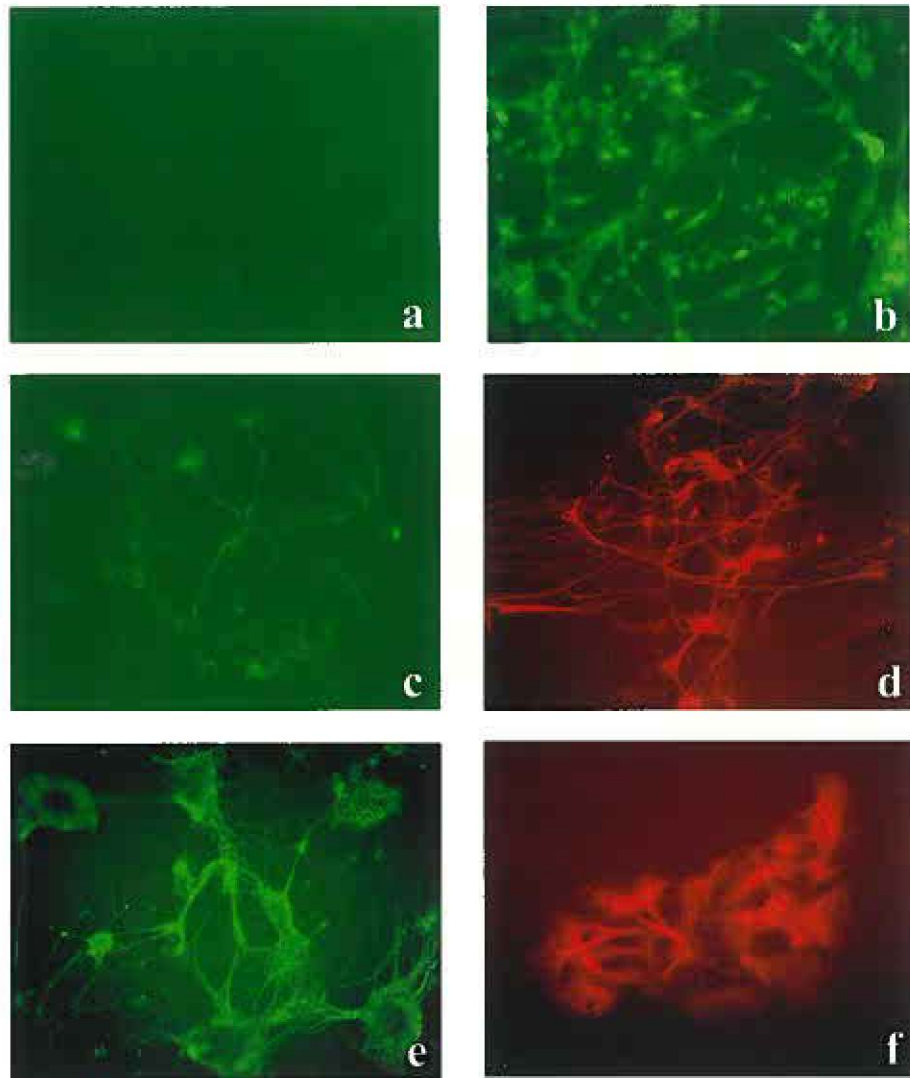


Figure 9: Immunofluorescence de cultures neuronales de 2 et 4 jours d'incubation provenant d'embryons de poulet E10.

- a) Contrôle, absence 1er anticorps, FITC seul.
- b) 2 jours, anti-GAP-43 et FITC (40x)
- c) 2 jours, anti-NE et FITC (40x)
- d) 2 jours, anti-GFAP et rhodamine (100x)
- e) 4 jours, anti-GAP-43 et FITC (100x)
- f) 4 jours, anti-GFAP et rhodamine (40x)

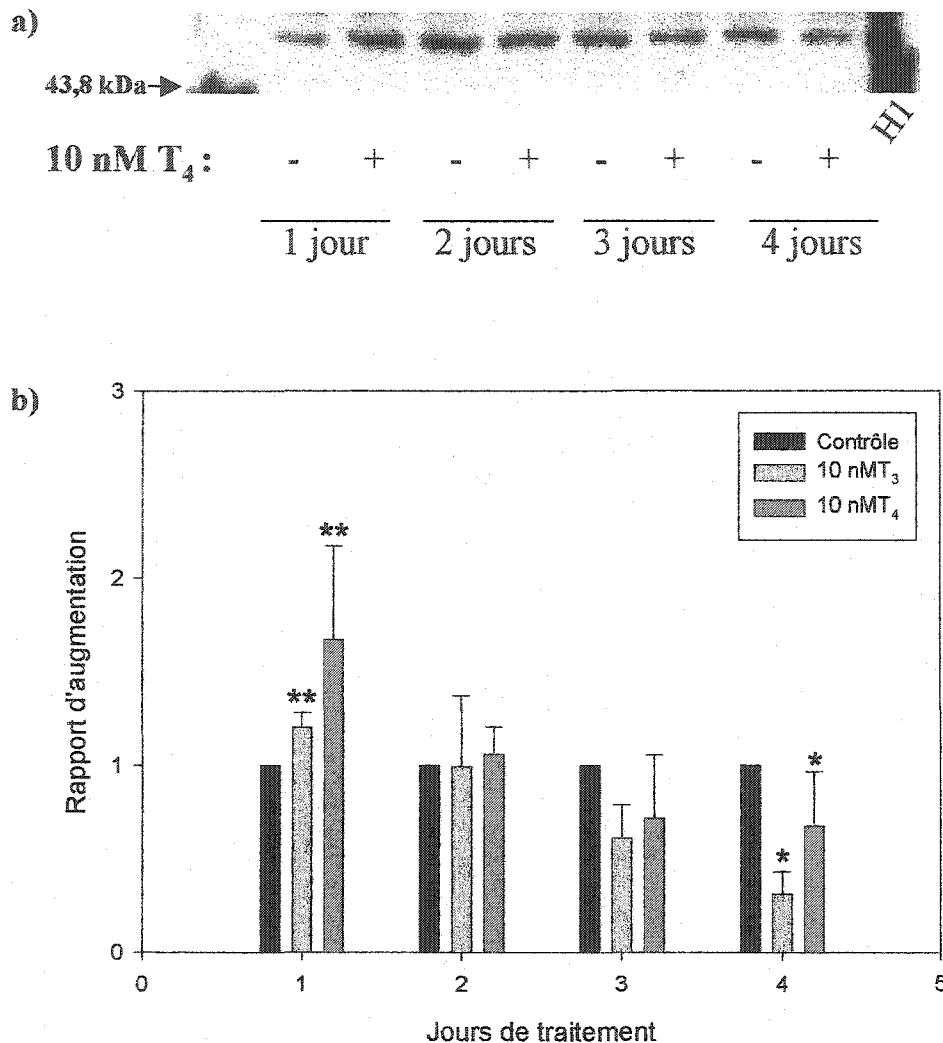


Figure 10: Influence des hormones thyroïdiennes sur l'expression de GAP-43 dans des cultures neuronales d'embryons de poulet E10.

a) Western représentatif de l'effet de 10 nM de T_4 sur l'expression de GAP-43.

30 μ g de protéines par échantillon sont déposées sur un gel de 10% polyacrylamide.

H1: homogénat de cortex d'embryons de poulet E14.

b) Après 24 heures de traitement, 10 nM de T_3 augmente l'expression de GAP-43 de $20,3 \pm 7,9\%$ et 10 nM de T_4 de $67,3 \pm 50\%$ par rapport au témoin. Au 4e jour de traitement quotidien, l'expression de GAP-43 est à $31 \pm 12,2\%$ avec 10 nM de T_3 et à $67,5 \pm 29\%$ avec 10 nM de T_4 , par rapport au témoin.

** $p \leq 0,02$, * $p \leq 0,05$

T_3 : $n=3$ sauf pour jour 1, $n=4$, T_4 : $n=6$.

résultats sont significativement différents de ceux obtenus avec les cellules exposées au tampon seul, avec une probabilité inférieure ou égale à 0,05.

L'importance de GAP-43 dans la neuritogénèse implique non seulement sa présence, mais aussi son état de phosphorylation du site Ser41. Ainsi, nous avons évalué celui-ci en utilisant un anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement une sérine phosphorylée suivie d'une phénylalanine. Ce motif est présent dans la protéine uniquement au niveau du site Ser41, ce qui permet d'isoler spécifiquement le site de phosphorylation de la protéine kinase C, et non celui de la caséine kinase II. Après une exposition aux hormones thyroïdiennes de 1 à 4 jours, aucune différence significative dans l'expression de la phosphoprotéine n'a été enregistrée (figure 11).

2- Actions rapides des hormones thyroïdiennes

2.1. Action des HT sur la phosphorylation de GAP-43

Comme certains effets des hormones thyroïdiennes, dont notamment la réorganisation du cytosquelette d'actine astrocytaire et l'activation de certaines kinases, sont relativement rapides (entre 20 minutes et 3 heures), nous avons montré une action rapide de la thyroxine sur la phosphorylation de GAP-43. La figure 12 illustre un immunoblot représentatif obtenu suite à une réaction immunologique de l'anticorps anti-phospho(Ser/thr)Phe avec une bande protéique associée avec GAP-43

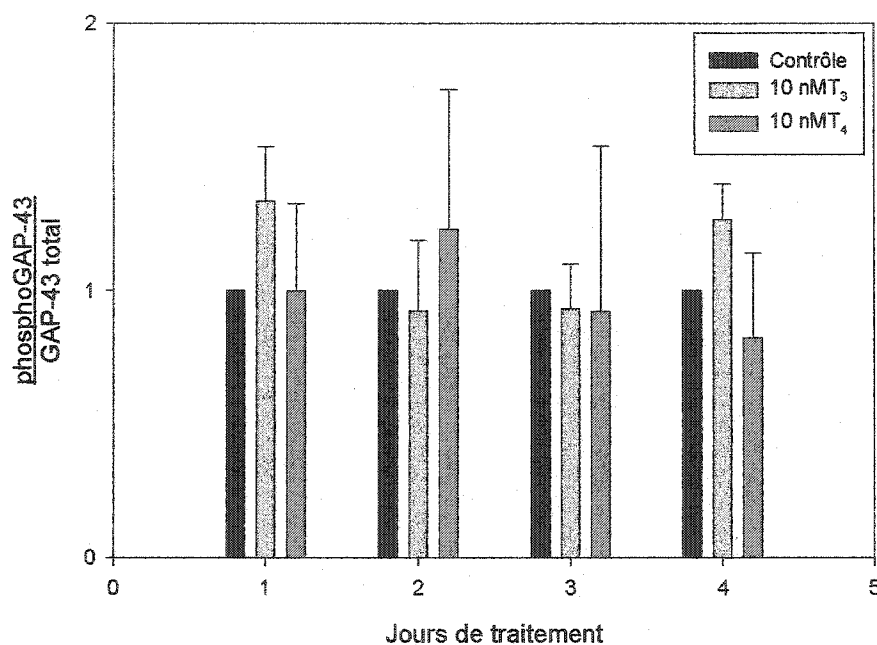


Figure 11: Influence des hormones thyroïdiennes sur la phosphorylation de GAP-43 dans des cultures neuronales d'embryons de poulet E10.

Aucune différence significative n'est enregistrée dans l'expression de phospho-GAP-43 après 1 à 4 jours de traitement quotidien à 10 nM de T₃ ou de T₄. La proportion de la phosphoprotéine est corrigée en fonction de l'expression de GAP-43 totale, et les valeurs obtenues sont exprimées par rapport au témoin.

T₃: n=2, T₄: n=6.

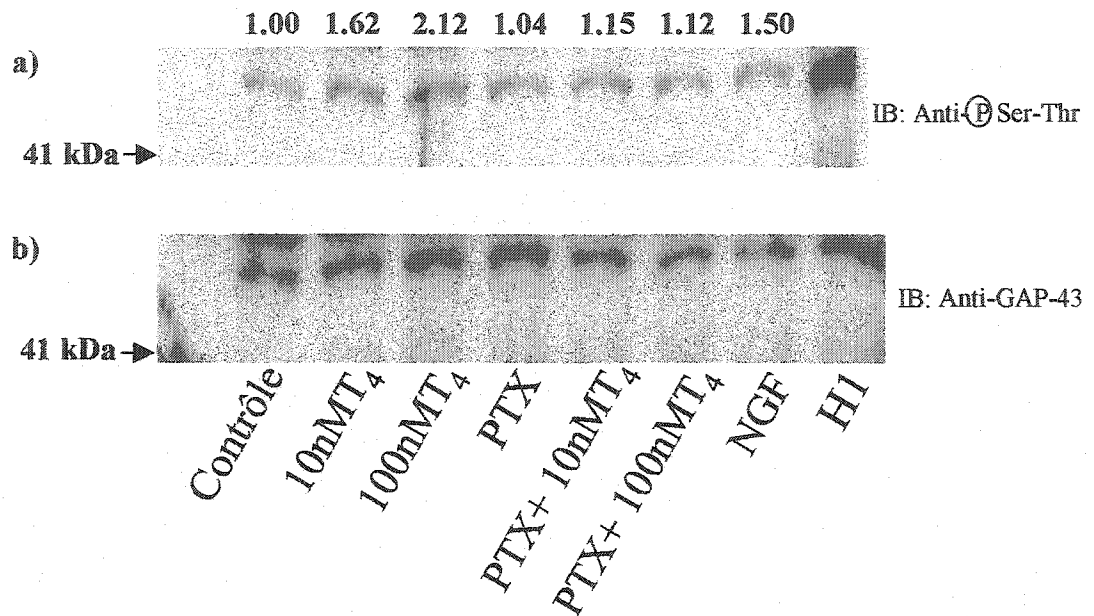


Figure 12: Phosphorylation de GAP-43 induite en 30 minutes par divers traitements, dans des cultures neuronales de 2 jours provenant d'embryons de poulet E10.

a) Un traitement à 10 et 100 nM de T₄ amplifient respectivement l'expression de phospho-GAP-43 de 62% et 112%, et ces augmentations sont partiellement inhibées par une préincubation de 18 heures avec 100 ng/ml de toxine de Pertussis. Le NGF accroît la phosphorylation de GAP-43 de 50% et représente un contrôle positif.

b) Les valeurs de phospho-GAP-43 sont corrigées en fonction de l'expression de la protéine totale.

H1: homogénat de cortex d'embryons de poulet E14.

Le poids moléculaire trouvé est d'environ 58,7 kDa, ce qui correspond à la valeur apparente rencontrée dans la littérature de 55 kDa (Allsopp et Moss, 1989). La hauteur de la bande est également confirmée grâce à l'utilisation d'un homogénat de cerveaux d'embryons de poulet au 14^e jour d'embryogénèse (H1, figure 12), période à laquelle l'expression néocorticale de GAP-43 est la plus élevée (Allsopp et Moss, 1989). Ainsi, suite à un traitement de 10 et 100 nM de T₄ pendant 30 minutes sur des cultures de 2 jours, la présence de la phosphoprotéine est amplifiée respectivement de 62 et 112% par rapport à la situation contrôle (figure 12). Ces valeurs sont normalisées en fonction de l'expression de GAP-43 totale, laquelle varie peu dans les diverses conditions étudiées. Nous avons également préincubé certaines cultures pendant 18 heures en présence de 100 ng/ml de toxine de Pertussis, afin d'isoler la contribution d'une éventuelle protéine Gi/Go dans l'activation d'une kinase par un récepteur membranaire. Cette préincubation inhibe partiellement l'effet de la thyroxine sur la phosphorylation de GAP-43, et l'application de la PTX seule ne semble pas avoir de conséquences sur l'expression de la phosphoprotéine (figure 12). Finalement, comme la neuromoduline est connue pour être phosphorylée suite à une induction trophique par le *nerve growth factor*, nous avons également exposé les cultures à 10 ng/ml de NGF pendant 30 minutes. La présence de phospho-GAP-43 est ainsi de 50% supérieure comparée à une exposition au tampon seul, et cet échantillon constitue notre contrôle positif. Les valeurs de la phospho-protéine sont corrigées par rapport à l'expression de la protéine totale dans chaque échantillon.

L'analyse comparative de plusieurs expériences nous a permis d'évaluer plus précisément l'effet rapide de 10 nM de T₄ sur la phosphorylation de GAP-43 (figure 13a). Un tel traitement a tendance à augmenter l'expression de la phosphoprotéine totale, soit de $44,9 \pm 23,4\%$ après 30 minutes et $35,0 \pm 22\%$ après 2 heures (figure 13a). Suite à 24 heures d'exposition, phospho-GAP-43 est en quantité comparable au témoin. Il est également important de noter que la proportion de phospho-GAP-43 est corrigée en fonction de l'expression totale de la protéine, laquelle reste relativement constante suite aux différentes périodes de traitement (figure 13b).

2.2. Action des HT sur la localisation de GAP-43

Par la suite, nous avons quantifié la proportion de GAP-43 contenue dans diverses fractions subcellulaires, soit la fraction du cytosquelette membranaire ou cortical, et la fraction cytoplasmique représentée majoritairement par les fibres de tension. Un traitement rapide à 10 et 100 nM de T₄ des cultures neuronales de 2 jours, augmente de manière dose-dépendante, la quantité de GAP-43 retrouvée au niveau membranaire et du cytosquelette cortical localisé directement sous la membrane plasmique (figure 14a). Ainsi, une exposition de 2 heures à 10 nM de thyroxine accroît de $47,4 \pm 12,7\%$ la présence de GAP-43 au niveau du cytosquelette membranaire, et cette différence avec le contrôle est significative avec $p \leq 0,05$ (figure 14a). De plus, ces mêmes traitements démontrent une tendance à diminuer la

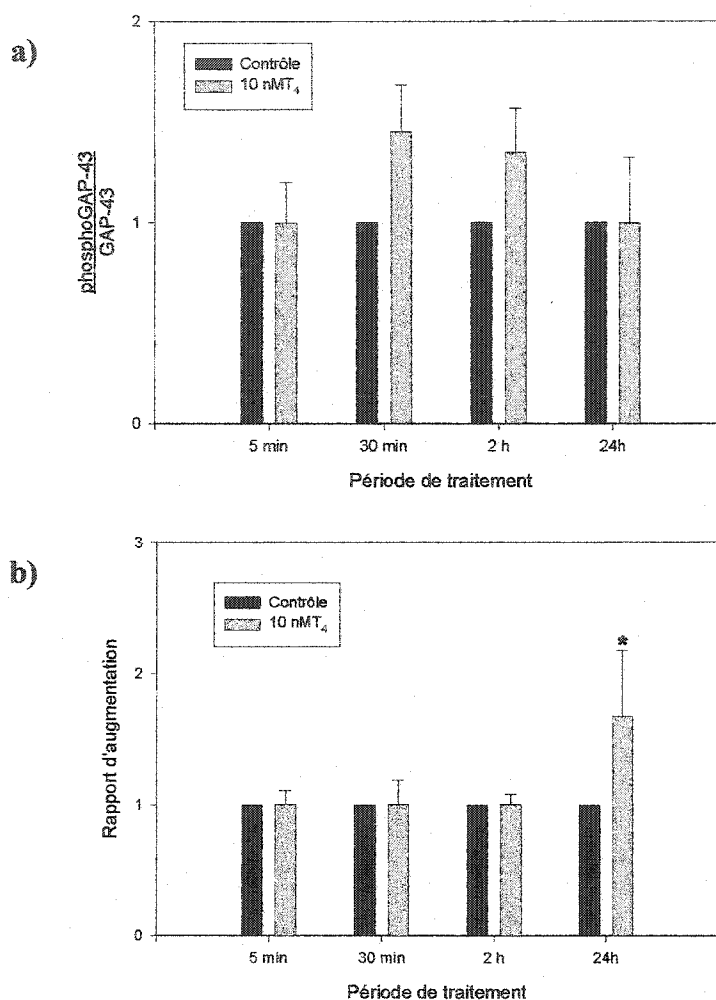


Figure 13: Influence de 10 nM de T₄ sur la cinétique de phosphorylation de GAP-43 dans des cultures neuronales de 2 jours provenant d'embryons de poulet E10.

a) Une exposition à 10 nM de T₄ augmente la phosphorylation de GAP-43 de $44,9 \pm 23,4\%$ après 30 minutes, et de $35 \pm 22\%$ après 2 heures. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes de celles rencontrées en condition contrôle. L'expression de phospho-GAP-43 est calculée en fonction de la quantité totale de GAP-43 recueillie. $n=4$.

b) La présence de GAP-43 totale varie très peu entre 5 minutes et 2 heures d'incubation avec 10 nM de T₄. 24 heures de traitement à 10 nM de T₄ augmente de manière significative l'expression de GAP-43 par rapport aux cellules incubées avec le tampon seul.

*, $p \leq 0,02$. $n=4$, sauf pour 24 heures, $n=6$.

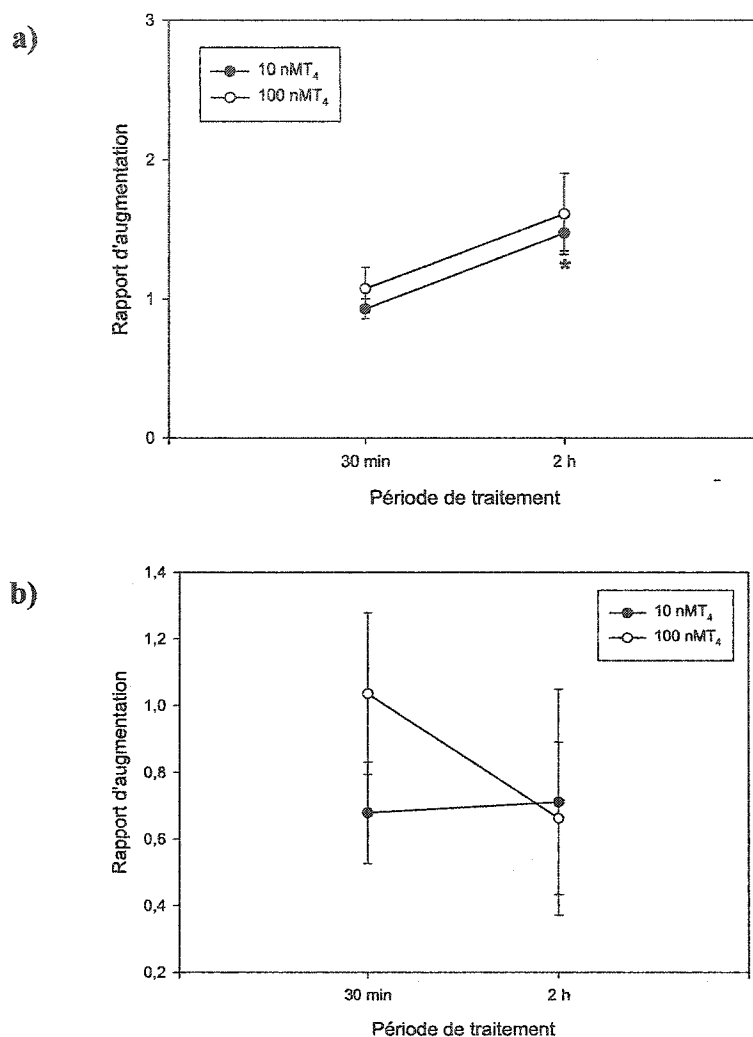


Figure 14: Influence d'une exposition de 30 minutes et 2 heures aux hormones thyroïdiennes sur la localisation subcellulaire de GAP-43 dans des cultures neuronales de 2 jours d'embryons de poulet E10.

a) Expression de GAP-43 au niveau de cytosquelette membranaire. Une exposition de 2 heures à 10 nM de T_4 accroît la présence de GAP-43 membranaire de $47,4 \pm 12,7\%$ et cette différence est significativement différente du contrôle. 100 nM de T_4 sur 2 heures favorise la localisation membranaire de GAP-43 de $61,2 \pm 29,1\%$ supérieure aux cellules incubées avec le tampon seul.

*, $p \leq 0,05$. $n=4$.

b) Expression de GAP-43 au niveau du cytosquelette. Un traitement à 10 et 100 nM de T_4 semble diminuer la fraction de GAP-43 retrouvée au niveau du cytosquelette. $n=2$.

présence de GAP-43 associée aux composantes du cytosquelette fibreux cytoplasmique et périnucléaire (figure 14b). Ainsi, même si la quantité totale de GAP-43 ne varie pas après 30 minutes et 2 heures de traitements (figure 13b), la localisation subcellulaire est modifiée par une exposition hormonale rapide.

Nous avons ensuite tenter de visualiser cette translocation protéique en utilisant la méthode de d'immunofluorescence directe et indirecte. Les cultures de 2 jours sont exposées pendant 2 heures au tampon seul (figures 15a-b) ou à 100 nM de T₄ (figures 15c-d-e-f), fixées, perméabilisées et incubées avec l'anticorps anti-GAP-43 suivie d'un anticorps secondaire couplé au FITC, et comarquées directement avec la phalloïdine reconnaissant l'actine filamenteuse. Cette technique nous permet ainsi de visualiser simultanément le cytosquelette d'actine et GAP-43 d'une même cellule. En situation contrôle, GAP-43 paraît distribuée uniformément à l'ensemble de la cellules (figure 15a). Suite au traitement à la thyroxine, un marquage immunologique ponctuel de GAP-43 est localisé au niveau membranaire et périphérique (figures 15c-e), comme le montre le marquage de l'actine polymérisée (figure 15d-f). Ces images sont obtenues à un grossissement de 100x.

3- Intéraction de GAP-43 et de l'actine

La neuromoduline est associée aux filaments d'actine via son segment carboxy-terminal, et nous avons vérifié si la présence d'hormones thyroïdiennes

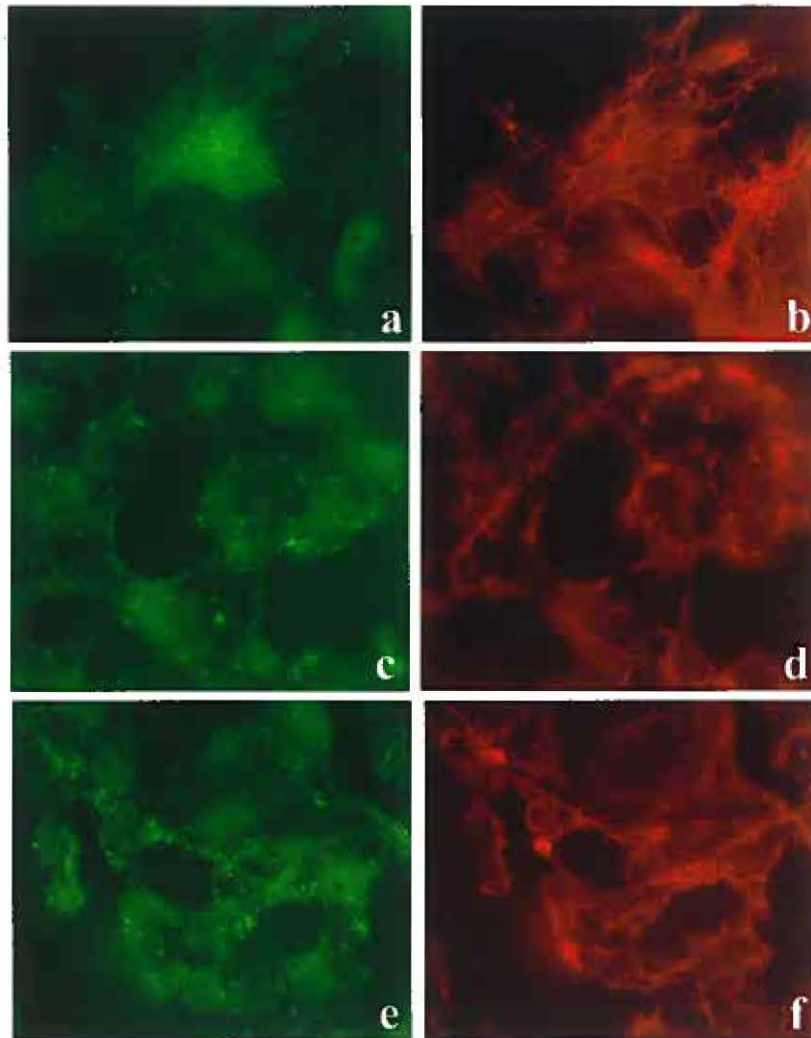


Figure 15: Comarquage en immunofluorescence de GAP-43 et de l'actine filamenteuse dans des cultures neuronales de 2 jours d'embryons de poulet E10. Suite à un traitement de 2 heures à 100 nM de T_4 ou au tampon physiologique, les cellules sont fixées, perméabilisées, et incubées simultanément en présence d'un anticorps anti-GAP-43 suivi d'un second couplé au FITC (a-c-e), et en présence de phalloïdine (b-d-f).
 Tampon seul: GAP-43 est localisé uniformément à travers l'ensemble du neurone (a).
 100 nM de T_4 : un fort marquage ponctuel de GAP-43 est observable en périphérie des neurones (c-e).
 Grossissement 100x.

modifie cette interaction. Suite à une immunoprécipitation de l'actine, nous avons effectué un immunobuvardage à l'aide de l'anticorps anti-GAP-43, afin d'isoler une éventuelle liaison entre ces deux protéines. Après 24 (figure 16a) et 48 heures (figure 16b), un traitement à 10 et 100 nM de T₄, paraît favoriser l'association de GAP-43 à l'actine. Par contre, même si un traitement à la thyroxine semble augmenter cette liaison, et ce de manière dose-dépendante, aucune différence observée n'est significative.

Par la suite, nous avons tenté de préciser cette tendance en analysant spécifiquement la liaison de GAP-43 à l'actine filamenteuse que contiennent les microfilaments. Nous avons alors précipité l'actine polymérisée des cellules témoin et des cellules traitées à 10 et 100 nM de T₄ après 24 (figure 17a) et 48 (figure 17b) heures d'exposition. Les résultats ne présentent aucune modification de l'incorporation de la neuromoduline dans le cytosquelette d'actine pour les cellules traitées aux hormones thyroïdiennes en comparaison avec celles exposées au tampon seul. De plus, ces mêmes conditions ne semblent pas favoriser une polymérisation plus importante de l'actine, que se soit après 1 (figure 18a) ou 2 (figure 18b) jours de traitement à diverses concentrations hormonales. Ainsi, la quantité de microfilaments à moyen terme semble stable et indépendante de la présence ou de l'absence d'hormones thyroïdiennes.

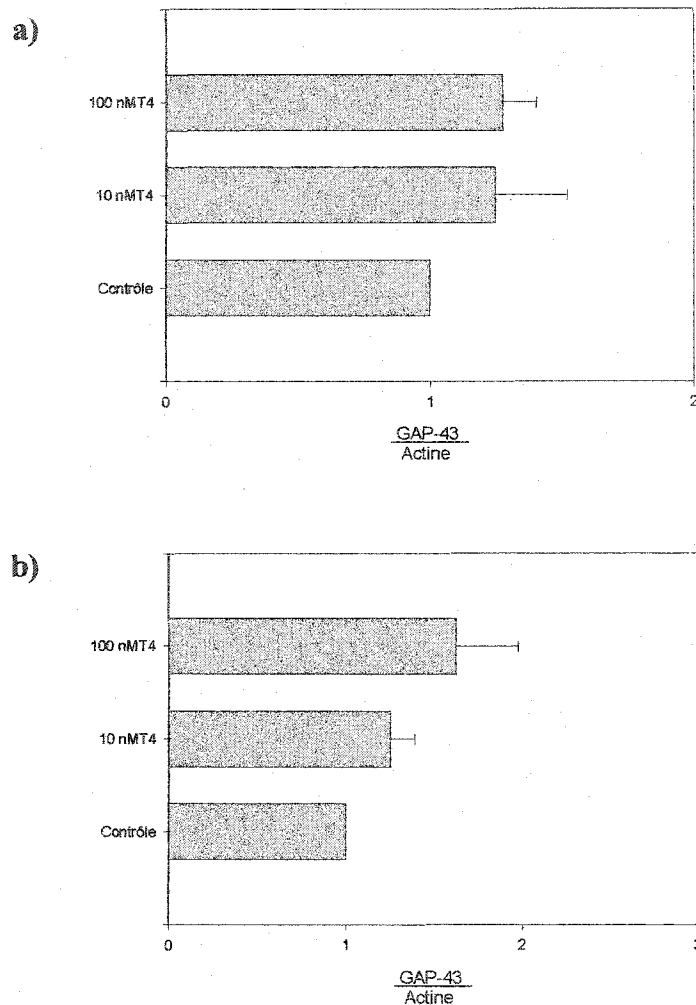


Figure 16: Coimmunoprécipitation de GAP-43 et de l'actine dans des cultures neuronales d'embryons de poulet E10, suite à un traitement à 10 et 100 nM de T_4 de 24 heures (a) et 48 heures (b).

a) Une exposition de 24 heures à 10 et 100 nM de T_4 augmente l'interaction entre GAP-43 et l'actine de $24,6 \pm 27,4\%$ et de $27,3 \pm 12,7\%$, mais ces valeurs ne sont pas significativement différentes du contrôle.

b) 48 heures de traitement à 10 nM de T_4 augmente la liaison de GAP-43 à l'actine de $25,4 \pm 13,7\%$, et 100 nM de T_4 l'accroît de $62,7 \pm 35,3\%$. Ces différences ne sont pas significatives par rapport aux cultures exposées au tampon seul. Ces résultats sont calculés en corrigeant l'expression de GAP-43 en fonction de la quantité d'actine précipitée.

n=3.

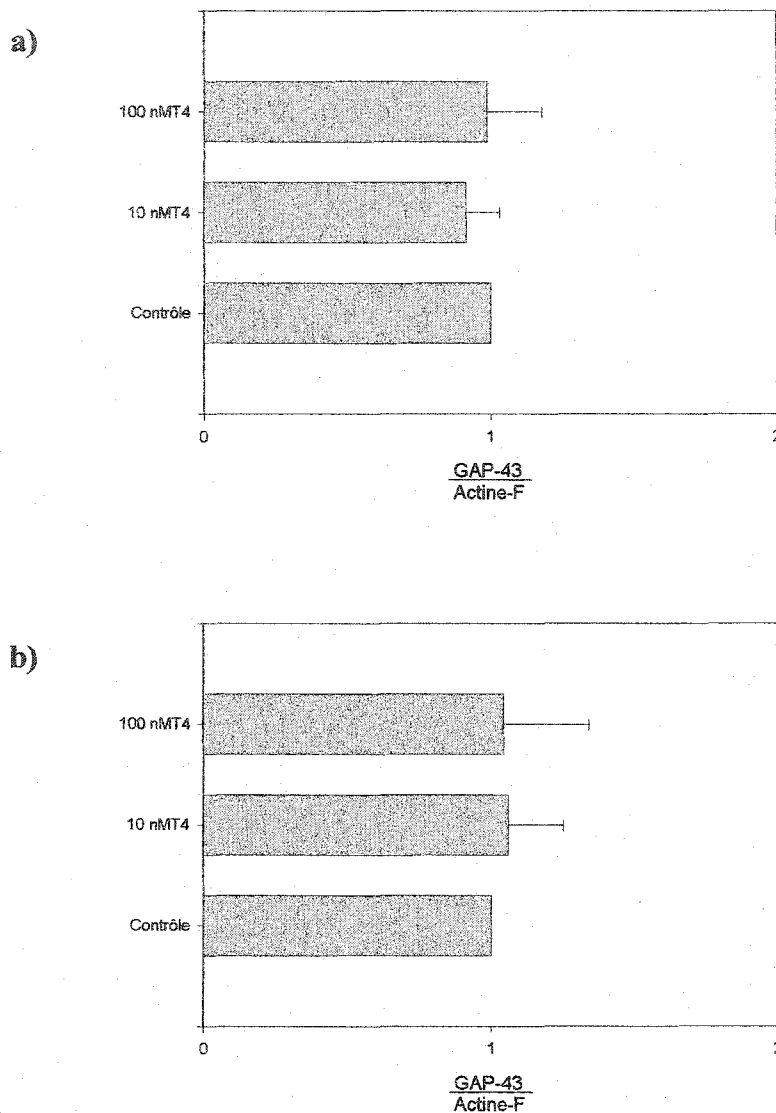


Figure 17: Influence de 10 et 100 nM de T_4 sur la liaison de GAP-43 à l'actine-F dans des cultures neuronales d'embryons de poulet E10.

a) Après 24 heures de traitement, 10 et 100 nM de T_4 ne modifie pas la liaison de GAP-43 à l'actine filamenteuse.

b) Un traitement de 48 heures avec 10 et 100 nM de T_4 n'influence pas l'interaction entre GAP-43 et les microfilaments.

La valeur de GAP-43 est corrigée en fonction de la quantité de microfilaments recueillis.

n=4

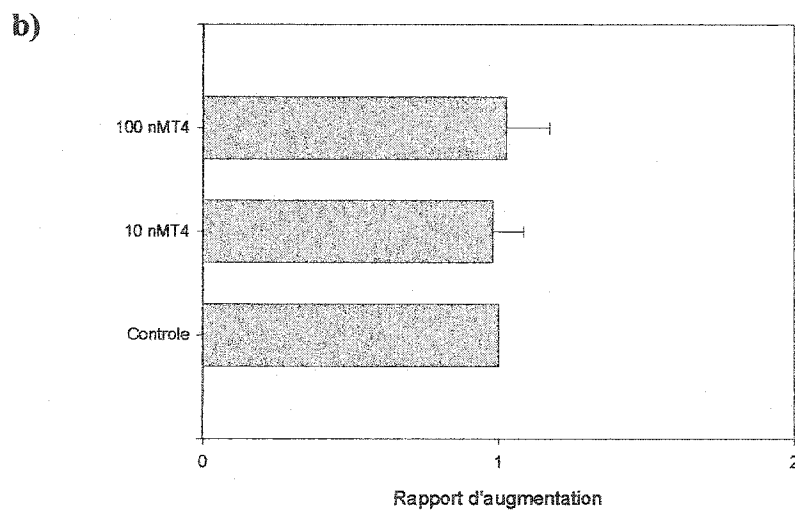
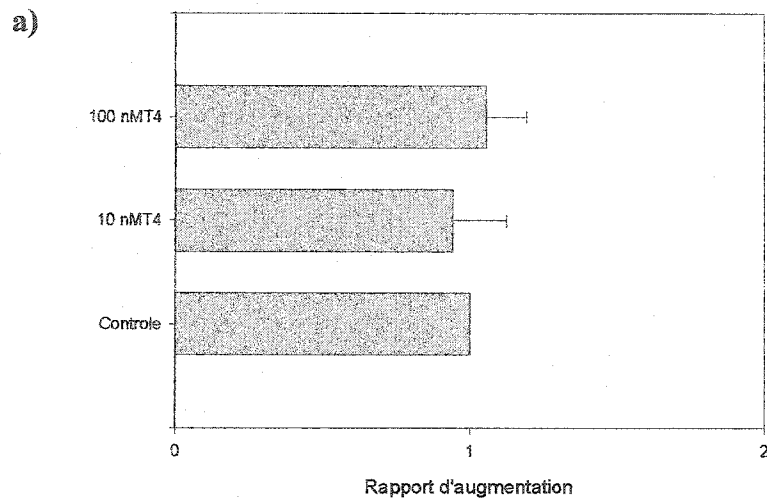


Figure 18: Influence de 10 et 100 nM de T_4 sur la polymérisation de l'actine dans des cultures neuronales d'embryons de poulet E10.

- a) 1 jour de traitement à 10 et 100 nM de T_4 ne modifie pas le contenu des cellules en actine-F par rapport au témoin.
- b) 2 jours de traitement quotidien à 10 et 100 nM de T_4 n'influence pas la proportion de microfilaments des neurones par rapport aux cultures incubées en présence du véhicule seul.

n=4.

VI. DISCUSSION

1. Caractérisation des cultures cellulaires

1.1. Adhésion et élongation neuritique

L'apparence morphologique des cultures neuronales révèle plusieurs informations sur les stades de différenciation en cours. Seulement 15 minutes d'inoculation sont nécessaires à l'adhésion des neurones de nos cultures d'embryons de poulet à la matrice chargée positivement, et la plupart des cellules présentent des prolongements après 24 heures d'incubation. Dans les deux premiers jours de culture, une forte concentration de neurones est observable, et ceux-ci sont dispersés de manière homogène sur la surface des boîtes de Pétri. Par la suite, aux jours 3 et 4 de culture, la présence d'agglomérats cellulaires peut s'expliquer par la migration des neurones initialement dispersés. Ce regroupement des cellules est accompagné de l'élaboration de neurites plus diffus et plus longs, qui relient les amas cellulaires. Des études d'immunofluorescence démontrent une certaine dispersion des cellules marquées avec GAP-43, un marqueur neuronal, après 2 jours de culture, et une agglomération de ces cellules neuronales devient évidente après 4 jours d'incubation. Ainsi, les prolongements qui sont établis rapidement après l'adhésion servent à assurer un meilleur attachement cellulaire, et ne sont probablement pas des neurites spécialisés, puisque leur apparition précède la phase de migration cellulaire. Des

études effectuées précédemment dans notre laboratoire soutiennent cette hypothèse. En effet, comme MAP2 et *tau*, qui sont des marqueurs spécifiques aux dendrites et aux axones respectivement, ne sont exprimés qu'après le 3^e jour de culture, la fonctionnalité et la spécialisation des élongations ne semble pas fixées avant ce stade. De plus, les études de Greis et Rosner (1990) effectuées avec des cultures neuronales d'embryons de poulet, confirment la séquence des stades de différenciation rencontrée dans nos cultures, en observant une migration cellulaire présente jusqu'à la 4^e journée de culture.

1.2 Neurones vs cellules gliales

Un autre élément important à relever, est la présence croissante de cellules gliales dans nos cultures. Ces observations sont corrélées avec la mise en évidence de foyers astrocytaires bien développés en immunofluorescence. Un marquage immunologique de GFAP est présent après seulement 2 jours de culture, et la complexité du réseau filamenteux astrocytaire augmente de manière importante après 4 jours d'incubation. Bien que l'adhésion différentielle favorise un enrichissement de la population neuronale, l'utilisation d'un agent anti-mitotique aurait été nécessaire à la suppression de toute prolifération gliale. Ainsi, parallèlement à la période d'incubation, la présence de cellules gliales augmente au fur et à mesure que les progéniteurs O-2A contaminants se divisent et se spécialisent. Ce fait est particulièrement évident aux 3^e et 4^e jours de culture lorsque les cellules sont traitées

aux hormones thyroïdiennes. Celles-ci peuvent effectivement amplifier la contamination neurogiale, puisqu'elles favorisent l'attachement des astrocytes (Farwell et *al.*, 1995) et leur différenciation en augmentant la polymérisation de leur réseau d'actine (Siegrist-Kaiser et *al.*, 1990).

1.3 Microtubules

Une exposition à 10 nM de thyroxine entre 24 et 48 heures augmente significativement la polymérisation des microtubules dans nos cultures neuronales d'embryons de poulet. Par contre, la triiodothyronine n'a pas d'effet durant cette même période. Comme seule la T₃ est active au niveau transcriptionnel, il est pertinent de suggérer une action non-génomique de la T₄ sur divers composantes du cytosquelette. Comme l'apparition de prolongements est associée avec une polymérisation accrue des microtubules parallèlement à une augmentation de l'actine filamenteuse, il est possible que l'effet observé sur les microtubules soient liés indirectement à une augmentation de l'étendue du cytosquelette d'actine. Plusieurs études ont démontrées que même si une concentration physiologique de thyroxine favorise la polymérisation du cytosquelette d'actine astrocytaire, la triiodothyronine n'a pas d'effet (Siegrist-Kaiser et *al.*, 1990 ; Leonard et Farwell, 1997). Ainsi, il est possible que la T₄ emprunte des mécanisme extra-nucléaires similaires dans les neurones, en agissant directement sur les microfilaments, ou en modifiant l'activité

d'une protéine associée à l'actine, ce qui influence indirectement la propension des microtubules à se développer.

Un autre élément qui tend à expliquer l'inefficacité de la triiodothyronine à stimuler la polymérisation des microtubules réside dans certaines expériences qui se sont intéressées à l'influence de cette hormone sur l'assemblage de la tubuline *in vitro*. Il semble alors que la T₃ diminue la polymérisation des microtubules provenant de cortex d'embryons de poulet, en augmentant la phosphorylation de MAP2c et *tau*. Puisque les sites de phosphorylation ainsi modifiés sont situés à proximité des domaines de liaison à la tubuline, cette action peut diminuer l'affinité des MAPs pour la tubuline, et par conséquent, la stabilité des microtubules (Avila et *al.*, 1994). Par ailleurs, même si, de son côté la thyroxine augmente la polymérisation des microtubules, elle active certaines kinases (PKC, PKA, MAPK) pouvant phosphoryler les MAPs (Lin et *al.*, 1996 ; Lin et *al.*, 1999). Il semble ainsi qu'un équilibre fin de l'état de phosphorylation des MAPs soit requis pour obtenir une action particulière sur l'instabilité dynamique des microtubules. Même si la question des MAPs n'a pas été traitée spécifiquement, il est pertinent de considérer certains des effets décrits précédemment pour mieux tenter d'expliquer la dynamique des microtubules dans nos cultures.

En plus d'influencer la stade de phosphorylation des MAPs, les hormones thyroïdiennes provoquent d'autres modifications post-transcriptionnelles. Un effet

marqué sur la conversion de la forme juvénile vers la forme mature de *tau* est observable selon le status thyroïdien. Il semble qu'une déficience en HT retarde cette transition (Nunez et *al.*, 1991). Cela aurait comme conséquence de diminuer la polymérisation des microtubules, puisque la forme adulte de *tau* possède une activité d'assemblage de la tubuline significativement plus grande que celle de l'entité immature (Couchie, et *al.*, 1986). De cette façon, l'établissement de structures architecturales stables serait différée par un traitement aux HT pour permettre un plus grand dynamisme des phénomènes de migration cellulaire et d'initiation de la neuritogénèse, impliquant plusieurs mouvements de croissance et de rétraction des prolongements. Ces considérations tentent donc d'expliquer l'inefficacité des HT à favoriser la polymérisation des microtubules dans nos cultures de cortex d'embryons de poulet après 3 et 4 jours de culture, lorsque les neurones terminent leur migration, établissent leur polarité cellulaire, et débutent l'élongation de prolongements spécialisés présentant un grand dynamisme par tatonnement pour évaluer la direction adéquate à emprunter.

La périodicité d'une exposition aux HT semble également importante, et contribue, par d'autres mécanismes que ceux impliquant les MAPs, à expliquer l'absence d'effet sur la polymérisation après 3 et 4 jours de culture. Effectivement, bien que nous observons une augmentation de la polymérisation des microtubules dans nos cultures neurones de 1 et 2 jours, cet effet est aboli aux jours de culture 3 et 4. Ainsi, durant ce stade, ni la T₃, ni la T₄ ne modifie la proportion de tubuline

assemblée en filaments. Comme seule la T₄ semble promouvoir la polymérisation des microtubules en phase précoce, il se peut qu'une augmentation de la transformation de la T₄ en T₃ explique cette insensibilité. En effet, la déiodinase du cerveau de poulet devient active au 12^e jour d'embryogénèse, ce qui correspond aux environs de la deuxième journée de culture (Bellabarba, 1988). De plus, cette enzyme est exprimée au niveau des astrocytes, dont la présence devient notable au 3^e et 4^e jour dans nos cultures. De cette façon, la déiodination de l'hormone active en hormone inactive semble corrélérer avec l'inefficacité des HT à promouvoir la polymérisation des microtubule lors de la phase de migration des cellules de nos cultures.

Même si aucune variation globale de la quantité des microtubules n'est observable après 3 et 4 jours d'incubation, cela n'implique pas nécessairement l'absence de modification des taux de polymérisation de la tubuline neuronale. Effectivement, comme la contamination gliale augmente avec la période d'incubation, il est possible qu'une augmentation des microtubules neuronaux soit masquée par une diminution de la survie neuronale. Ainsi, pour évaluer la croissance du cytosquelette des cellules neuronales par rapport à la globalité de la population cellulaire, il est pertinent d'utiliser un marqueur neuronal conjointement avec un indicateur de la croissance neuritique. C'est en premier lieu dans cette optique que le marqueur neuronal GAP-43 est utilisé. Ainsi, comme l'augmentation de la polymérisation des microtubules engendrée par une exposition à la thyroxine dans nos cultures de 1 et 2 jours est supérieure à l'augmentation de l'expression de GAP-

43 après un même traitement, l'effet de la thyroxine à ce niveau semble spécifique aux neurones, d'autant plus que la contamination gliale est faible à ce stade. À l'opposé, comme aucune variation de la polymérisation n'est observée après 4 jours d'incubation, mais que la présence de GAP-43 diminue, il est possible que l'élongation des prolongements des neurones présents soit masquée par une diminution de la survie neuronale, ou que la polymérisation accrue des microtubules astrocytaires contribue à l'augmentation du pool total des microtubules.

1.4 Hétérogénéité de la réponse cellulaire selon plusieurs paramètres

L'utilisation d'une concentration adéquate d'hormone et d'une période de sensibilité thyroïdienne rend l'étude de ce modèle particulièrement délicat. Bien qu'une concentration quotidienne de 10 nM de T_3 demeure physiologique, certaines différences peuvent révéler des conséquences importantes sur le développement. Ainsi, une hyperstimulation thyroïdienne peut engendrer des effets aussi délétères qu'un détriment hormonal (Nunez et al., 1991). Le stade de développement et la région du SNC de laquelle provient les cellules, l'hétérogénéité des types neuronaux au niveau de l'expression des différents isoformes des RHT et des cofacteurs, assurent une très grande spécificité de la réponse cellulaire à une stimulation aux HT. Par exemple, bien qu'une concentration physiologique de T_3 augmente la survie des cellules granulaires de rats en culture (Heisenberg et al., 1992) et des neurones embryonnaires du septum de rat, ce même traitement n'a pas d'effet tant sur la survie

que sur la morphologie des neurones cérébrocorticaux en cultures (Filipcik et al. 1994). Les études de Walker (1996), en utilisant des cultures enrichies en cellules neuronales et des cultures mixtes, démontrent également l'importance de la présence de la neuroglie dans l'accroissement neuritique assurée par les HT. Effectivement, bien que la T_3 favorise la survie cellulaire des cultures neuronales pures et mixtes, ses effets sur l'amplification de la croissance neuritique sont atténués suite à l'élimination des cellules non-neuronales. Ainsi, les HT agissent directement sur les neurones en favorisant leur survie, et engendrent une augmentation de la croissance neuritique tardive par une action paracrine par l'entremise de cellules non-neuronales (Walker, 1996).

1.5.GAP-43

Un traitement de 24 heures aux hormones thyroïdiennes augmente la présence de GAP-43 dans nos cultures neuronales d'embryons de poulet. Comme la présence d'un élément de réponse aux HT n'a pas été identifié dans la région promotrice du gène, il semble peu probable que cette augmentation soit associée à une augmentation de la transcription. De plus, une telle régulation génique est rejetée par le groupe de Savettieri et *al* (1999), qui n'observe aucune modification de la concentration de cette protéine dans des cultures neuronales d'embryons de rat traitées aux hormones thyroïdiennes. Ainsi, l'augmentation de GAP-43 après 24 heures de traitement est probablement due à une action au niveau de l'adhésion initiale ou de la survie

neuronale. De plus, comme la présence de la protéine semble régulée par la suite à la baisse par une exposition hormonale, la possibilité que les HT puissent à la fois augmenter et diminuer son expression semble peu probable. Ainsi, les variations de l'expression de GAP-43 par les hormones thyroïdiennes sont directement liées à un effet global sur la survie neuronale et sur la prolifération des cellules gliales. De cette façon, les hormones thyroïdiennes augmentent la proportion de cellules neuronales, possiblement en favorisant leur attachement à la surface de culture et leur survie subséquente. Par la suite, à la 2^e et 3^e journée de culture, les HT peuvent présenter des répercussions mineures sur la migration cellulaire, et favorisent, vers le 4^e jour d'incubation la prolifération et la différenciation astrocytaire, ce qui a comme conséquence de diminuer la portion de neurones dans la population hétérogène de cellules.

Bien que l'avenue d'une régulation génique de GAP-43 par les hormones thyroïdienne soit peu probable, l'activation extra-génomique de certaines kinases par la thyroxine suggèrent une modulation de l'activité de la protéine par certaines modifications post-transcriptionnelles (Lin et *al.*, 1996 ; Lin et *al.*, 1999). GAP-43 peut être phosphorylée par la PKC, et cette modification engendre des répercussions importante sur la liaison de la protéine à l'actine et sur sa capacité à amplifier la polymérisation des microfilaments (Rosner et Vacun, 1999). Comme certains des effets les mieux connus des hormones thyroïdiennes sur la différenciation cellulaire utilise le cytosquelette d'actine, nous avons perçu GAP-43 comme un site d'action

potentiel des HT. Ainsi, comme les microfilaments semblent être une cible d'action spécifique à la thyroxine (Siegrist-Kaiser et *al.*, 1990 ; Leonard et Farwell, 1997), et que les effets observés dans nos cultures sont majoritairement engendrés par celle-ci, nous nous sommes attardés à l'étude de la phosphorylation de GAP-43 par les HT, en insistant sur la T₄.

L'exposition chronique aux hormones thyroïdiennes sur 1 à 4 jours de nos cultures neuronales n'influence pas de manière significative l'état de phosphorylation de GAP-43. La grande variation des résultats obtenus semblent souligner un grand dynamisme de la proportion de phosphoprotéine par rapport à la protéine totale, ou un problème d'hétérogénéité cellulaire. De plus, comme plusieurs facteurs peuvent influencer simultanément cette phosphorylation, nous avons tenté d'observer un effet spécifique de la thyroxine en isolant une action rapide et transitoire de l'hormone.

2- Actions rapides des hormones thyroïdiennes

2.1- Phosphorylation transitoire de GAP-43

Nous avons établi la cinétique de phosphorylation de GAP-43 suite à une exposition à la thyroxine. La T₄ est utilisée car elle est souvent plus apte que la T₃ à produire des effets rapides, notamment sur la phosphorylation des MAPK,

l'internalisation de la déiodinase par la polymérisation de l'actine, et sur l'attachement cellulaire à la laminine (Lin et *al.*, 1999 ; Farwell et Leonard, 1997 ; Farwell et *al.*, 1995). Il semble que l'action de la T₄ dans nos cultures neuronales d'embryons de poulet soit maximale à 30 minutes d'incubation, pour ensuite s'abaisser graduellement jusqu'à 24 heures, sans modification notable des niveaux d'expression de la protéine totale. Cette phosphorylation semble être en grande partie inhibée par un prétraitement à la toxine de Pertussis, ce qui suggère la contribution d'un récepteur membranaire couplé à G_i/G_o. Cette inhibition partielle permet de spéculer sur l'existence de mécanismes additionnels empruntés par les hormones thyroïdiennes.

Le calcium semble représenter le premier messenger de l'action rapide des HT au niveau de la membrane plasmique de plusieurs tissus (Segal, 1990). Certaines études effectuées avec des thymocytes *in vivo* et des cultures de cellules hypophysaires ont effectivement démontrées que les HT provoquent une augmentation de calcium intracellulaire rapide et transitoire, qui décline ensuite jusqu'à 10 à 30 minutes (Segal et Ingbar, 1989 ; Roussel et *al.*, 1995). Au niveau de la glande hypophysaire, cet influx calcique pourrait être engendré par l'activation hormonale directe de canaux calciques sensibles à la dihydropyridine et à la conotoxine (Roussel et *al.*, 1995). Ceci pourrait favoriser la phosphorylation de GAP-43 en permettant la dissociation de la calmoduline et en libérant le motif

phosphorylable par la PKC β II, une enzyme dépendante du calcium (Sheu et *al.*, 1990). De cette façon, en agissant sur l'homéostasie ionique, les hormones thyroïdiennes pourraient avoir une influence majeure sur plusieurs intermédiaires cytoplasmiques, dont les enzymes sensibles à la concentration calcique.

2.2- Translocation rapide de GAP-43

L'augmentation transitoire de la phosphorylation de GAP-43 peut avoir des effets importants sur la localisation subcellulaire de la protéine. Bien qu'elle soit située principalement au niveau du cytosquelette sous-jacent à la membrane plasmique, dans des régions fortement attachées au substrat, elle transige entre le cytosquelette, le cytoplasme et la membrane plasmique (Meiri et *al.*, 1990; Tejero-Diez et *al.*, 2000). Cette translocation est conditionnée par l'état de phosphorylation de la protéine, puisque la phosphoprotéine est dirigée majoritairement vers le squelette directement sous la membrane plasmique interne (Meiri et *al.*, 1996). Il semble en fait que sa localisation membranaire soit essentielle à son activité, car l'inhibition de cette phosphorylation entraîne des effets marqués sur l'adhésion cellulaire et la composition du cytosquelette neuritique (Meiri et *al.*, 1996).

En prenant en compte ces considérations, il nous a semblé pertinent d'observer la localisation subcellulaire de GAP-43 induite par une exposition rapide à

la thyroxine dans nos cultures neuronales. Comme elle favorise la phosphorylation de GAP-43 après 30 minutes et 2 heures de traitement, nous avons tenté d'isoler une translocation suite à cet effet. Nous observons ainsi une augmentation de la concentration de la protéine au niveau du cytosquelette membranaire cortical, parallèlement à une diminution de sa présence au niveau du cytosquelette constitué majoritairement des fibres de tension cytoplasmique. Cette translation est confirmée par l'observation en immunofluorescence d'une localisation différentielle de GAP-43 selon la présence ou l'absence d'hormones. Ainsi, alors que le marquage immunologique de la protéine est diffus à travers la globalité de la cellule en absence d'hormone, une exposition de 2 heures à la thyroxine favorise l'expression ponctuelle de GAP-43 au niveau membranaire, en périphérie de la cellule. Cette localisation peut donc promouvoir certaines fonctions de GAP-43, en favorisant son rapprochement physique à certaines molécules membranaires impliquées dans la différenciation neuronale.

GAP-43 est un facteur d'échange nucléotidique connu pour doubler le taux de libération du GDP de la sous-unité α_o (Strittmatter et *al.*, 1991). La régulation de l'activité de G_o par GAP-43 est d'autant plus évidente si l'on considère l'homologie marquée des sept premiers acides aminés de la molécule avec les récepteurs membranaires couplés à G_o (Strittmatter et *al.*, 1990). Également, comme GAP-43 et G_o sont colocalisées en très forte concentration au niveau des cônes de croissance et

des régions de contacts homophiliques, il est possible que cette protéine hétérotrimérique serve de centre d'intégration des signaux extra et intracellulaires (Apel et Storm, 1992 ; Strittmatter et *al.*, 1990).

Ainsi l'action rapide des hormones thyroïdiennes sur la phosphorylation et la translocation de GAP-43 dans nos cultures neuronales d'embryons de poulet pourrait augmenter l'activité des effecteurs de G_o , dont les canaux calciques et potassiques, ainsi que la phospholipase C, et assurer une certaine stabilisation structurelle transitoire (Strittmatter et *al.*, 1991). Puisque la toxine de Pertussis bloque l'interaction du récepteur membranaire, mais non de GAP-43 avec G_o , elle semble bloquer la majorité des effets, lesquels peuvent être engendrés par l'induction d'un récepteur membranaire aux HT (Strittmatter et *al.*, 1991). La fraction résiduelle des effets pourrait impliquer l'activation séquentielle directe de canaux calciques par les HT suivi d'un influx calcique. Cette augmentation du calcium intracellulaire activerait par la suite une série d'effecteurs cytoplasmiques sensibles au calcium, dont la PKC, ce qui favoriserait la phosphorylation de GAP-43, sa translocation à la membrane plasmique et la régulation subséquente d'une protéine hétérotrimérique G_o impliquée dans la motilité neuritique. Ainsi dans notre modèle cellulaire, les HT peuvent favoriser la phosphorylation rapide de GAP-43 et sa translocation subséquente vers la membrane selon plusieurs voies.

3- Interaction de GAP-43 et de l'actine

En plus d'avoir des répercussions sur la localisation de la protéine, la phosphorylation de GAP-43 favorise son association avec l'actine et la polymérisation des microfilaments isolés (He et *al.*, 1997). Comme un traitement aux HT semble favoriser la phosphorylation de GAP-43, nous avons voulu vérifier l'intensité de l'association entre l'actine et GAP-43 selon le statut thyroïdien. Ces deux protéines cosédimentent lors de l'extraction des composantes du cytosquelette, et la phosphoprotéine est colocalisée avec l'actine filamenteuse dans des cultures primaires de ganglions de la chaîne dorsale de rat (He et *al.*, 1997). Un traitement à la thyroxine de 24 à 48 heures a tendance à augmenter de manière dose-dépendante la liaison de GAP-43 à l'actine totale dans nos cultures de cortex d'embryons de poulet. Par contre, une même traitement semble avoir peu d'effet sur l'association de GAP-43 à l'actine filamenteuse et sur la polymérisation des microfilaments. Ainsi, bien que la phosphorylation induite par la thyroxine pourrait expliquer une affinité accrue entre ces protéine, il semble que d'autres facteurs soient nécessaires à l'accroissement et à stabilisation des microfilaments.

Comme la présence de la phosphoprotéine est associée à l'établissement d'une cytoarchitecture stable, et qu'un grand dynamisme morphologique est requis lors de la migration et de l'établissement des prolongements neuritiques initiaux, il se pourrait qu'une exposition aux HT favorise une certaine fluidité du cytosquelette. Il a

été également postulé que phospho-GAP-43 peut séquestrer une population de monomères d'actine pour éviter leur participation au cycle de polymérisation et de dépolymérisation (He et *al.*, 1997). De plus, comme l'augmentation de la phosphorylation de GAP-43 engendrée par les HT est transitoire, il est possible que cette stimulation soit insuffisante pour être traduite en une modification persistante de la fraction d'actine soluble par rapport à l'actine filamenteuse. L'apparition de phospho-GAP-43 et l'accumulation d'actine-F sont des phénomènes qui peuvent survenir aussi rapidement que 15 à 30 minutes suite à l'activation de PKC (Rosner et Vacun, 1999).

En plus d'être instaurée rapidement, la translocation de GAP-43 et son influence sur la polymérisation de l'actine sont des phénomènes localisés. La majorité des cellules contient 3 réseaux distincts de filaments d'actine. La partie centrale de la cellule présente des faisceaux de fibres contractiles communément appelées fibres de tension. Le cortex cellulaire est situé directement sous la membrane plasmique et les filopodes sont composés de faisceaux d'actine parallèles et serrés (Alberts et *al.*, 1994). Puisque GAP-43 s'associe à la périphérie cellulaire, elle interagit directement avec le réseau d'actine cortical sous-jacent à la membrane (Widmer et Caroni, 1993). L'extraction du cytosquelette des cultures neuronales ne permet pas de différencier la contribution de chaque type de filament, ce qui peut masquer un effet localisé sur la polymérisation de l'actine sous-membranaire. Bien que la différenciation cellulaire est généralement associée à une augmentation de l'actine filamenteuse, les

conséquences de la phosphorylation de GAP-43 peuvent impliquer une augmentation de la stabilité des microfilaments au niveau périphérique seulement (Alberts et *al.*, 1994). C'est en effet ce réseau particulier qui est influencé par une diminution de GAP-43 lors d'incubations avec des oligonucléotides antisens dirigés contre la protéine dans des cultures de neurones sensoriels (Dent et Meiri, 1998). Malgré toutes ces considérations, le fait qu'une exposition aux HT ne modifie pas la polymérisation de l'actine est surprenant, puisque plusieurs études rapportent une diminution de la fraction d'actine-F en hypothyroïdie (Paul et *al.*, 1992 ; Biswas et *al.*, 1997). De plus, comme l'effet de la thyroxine sur la phosphorylation de GAP-43 est transitoire, il serait intéressant d'étudier la dynamique de l'actine dans des temps plus courts, soit 2 heures après la stimulation hormonale.

VII. CONCLUSION

Contrairement à la triiodothyronine, un traitement de 24 à 48 heures à la thyroxine augmente la polymérisation des microtubules dans nos cultures enrichies en neurones d'embryons de poulet, et cet effet disparaît dans les jours subséquents de culture. De plus, la T₄ amplifie la présence du marqueur neuronal GAP-43 dans les cultures traitées pendant 24 heures. Cet effet est sans doute lié à une augmentation de l'attachement et de la survie neuronale, puisque l'absence d'un élément de réponse aux HT dans le promoteur de la protéine rejette l'hypothèse d'une régulation génomique par les HT. De plus, comme la thyroxine est plus efficace que la triiodothyronine pour promouvoir ces effets dans nos cultures neuronales, l'implication d'un mécanisme extra-génomique paraît évident. Les jours 3 et 4 de cultures présentent une expression moindre de GAP-43, et ceci peut être dû à l'augmentation de la prolifération et de la différenciation astrocytaire engendrée par les hormones thyroïdiennes. Bien que les HT puissent influencer directement la différenciation neuronale en favorisant leur attachement initial et leur survie, une action paracrine sur l'élongation neuritique par l'entremise des cellules gliales ne peut être rejetée.

En plus d'être un indicateur de la survie neuronale, GAP-43 et son état de phosphorylation engendre des répercussions notables sur l'adhésion et la morphologie cellulaire. Les conséquences les plus frappantes des hormones thyroïdiennes se

présentent de manière rapide et transitoire, après 30 minutes à 2 heures de traitement. La thyroxine amplifie la phosphorylation de GAP-43 et favorise sa translocation vers le cytosquelette sous-membranaire. La localisation de la protéine est capitale dans l'établissement de sa fonction. De par sa colocalisation importante avec une protéine G_o au niveau des cônes de croissance et des contacts cellules-cellules, l'attribution d'un effet de GAP-43 sur l'attachement et sur la migration cellulaire semble pertinente. Bien qu'il soit possible que la phosphorylation de GAP-43 soit influencée par la stimulation d'un récepteur membranaire, il est probable que la modification des concentrations calciques intracellulaires par les HT favorise cet effet directement par l'activation d'intermédiaires cytoplasmiques dépendants du calcium. Ainsi, la phosphorylation de GAP-43 pourrait permettre une augmentation de la rigidité des filaments d'actine et l'élaboration de structures neuritiques et de points d'adhésion cellulaires stables. Par contre, dans notre modèle, il semble que les HT ne provoquent qu'une augmentation transitoire de phospho-GAP-43, avec peu de variations persistantes de ses niveaux après 1 à 4 jours de culture. Ceci pourrait avoir comme conséquence de favoriser le dynamisme du cytosquelette et la fluidité cellulaire nécessaire à la migration.

En résumé, il semble que les hormones thyroïdiennes engendrent des effets différentiels selon le stade de différenciation neuronal et selon la présence de cellules neurogliales. Alors qu'elles augmentent la survie et l'adhésion initiale des neurones, elles paraissent favoriser une certaine fluidité architecturale nécessaire à la migration

et au dynamisme des neurites en élongation et en rétraction, en ne favorisant l'élaboration de structures stables que transitoirement. Les HT semblent également amplifier la phosphorylation rapide et transitoire de GAP-43 selon divers mécanismes extragénomiques impliquant l'activation d'un récepteur membranaire et/ou la régulation des niveaux de calcium intracellulaires. Cette action favorise ensuite la translocation de GAP-43 vers le cytosquelette cortical, où elle peut activer certains intermédiaires impliqués dans la différenciation cellulaire, telle la protéine G_o . Ainsi, comme les HT peuvent modifier l'activité de phosphorylation de certaines kinases impliquées dans diverses voies de différenciation, elles engendrent des répercussions complexes sur plusieurs stades du développement neuronal, et GAP-43 semble être un intermédiaire potentiel à l'action rapide, non-génomique des hormones thyroïdiennes.

VIII. REMERCIEMENTS

Je tiens d'abords à remercier le docteur Diego Bellabarba pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir suggéré un projet à la lumière de mes intérêts. Tout en supervisant mes travaux, vous m'avez permis d'acquérir une indépendance et une polyvalence qui me serviront autant dans ma vie professionnelle que personnelle.

Je voudrais également remercier particulièrement le docteur Liette Laflamme, dont l'expérience et la compétence exemplaire m'ont grandement aidé à l'accomplissement de mon travail.

J'aimerais aussi remercier le docteur Nicole Gallo-Payet, qui, par l'entremise de son enseignement, a élargi mes connaissances sur le système nerveux, et sur la physiologie systémique. La qualité de vos recherches sont, pour plusieurs, un exemple à suivre. Je voudrais aussi mentionner l'implication de Louis Gendron, qui, par l'entremise d'intérêts communs, m'a fourni mille et une informations relatives à mes recherches sur la différenciation neuronale.

Merci à Geneviève, Marie-Belle et Simon, qui ont perpétué une ambiance de travail très agréable et dynamique.

Je tiens également à remercier mes parents, qui m'encouragent et me supportent depuis plusieurs années déjà, et qui ont fait naître en moi une grande curiosité intellectuelle.

Finalement, merci aux Dr Diego Bellabarba, Dre Nicole Gallo-Payet et Dr Jack Puymirat, qui ont accepté de corriger et d'évaluer ce mémoire.

IX. RÉFÉRENCES

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Watson, J.D. (1994). «Biologie moléculaire de la cellule» 3^e édition, Médecine-Sciences. Flammarion, New York.
- Allsopp, T.E. et Moss, D.J. (1989). «A developmentally regulated chicken neuronal protein associated with the cortical cytoskeleton» Journal of Neuroscience 9(1) : 13-24.
- Amoureux, M.-C., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. et Crossin, K.L. (2000). «N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype» Journal of Neuroscience 20(10): 3631-3640.
- Aniello, F., Couchie, D., Bridoux, A.M., Gripois, D. et Nunez, J. (1991). «Splicing of juvenile and adult *tau* mRNA variants is regulated by thyroid hormone» PNAS 88 : 4035-4039.
- Apel, E.D. et Storm, D.R. (1992). «Functional domains of neuromodulin (GAP-43)» Perspectives on Developmental Neurobiology 1(1): 3-11.

Avila, J., Dominguez, J. et Diaz-Nido, J. (1994). «Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development» Int J Dev Biol. **38**: 13-25.

Baizer, L., Alkan, S., Stocker, K. et Ciment, G. (1990). «Chicken growth-associated protein (GAP)-43: primary structure and regulated expression of mRNA during embryogenesis» Molecular Brain Research **7**: 61-68.

Bellabarba, D. (1988). «Mechanism of action of thyroid hormones during chick embryogenesis» Amer. Zool. **28**: 389-399.

Banker, G. et Kimberly, G. (1998). «Culturing Nerve Cells» 2nd edition. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

Baulieu, E.-E. et Kelly, P. A. (1990). «Hormones, from molecules to disease» Hermann, New York.

Benowitz, L.I., Perrone-Bizzozero, N.I. et Finklestein, S.P. (1987). «Molecular properties of the growth-associated protein GAP-43 (B-50)» Journal of Neurochemistry **48**: 1640-1647.

Bernal, J. et Nunez, J. (1995). « Thyroid hormones and brain development » European Journal of Endocrinology **133**: 390-8.

Biswas, S.C., Pal, U. et Sarker, P.K. (1997). «Regulation of cytoskeletal proteins by thyroid hormone during neuronal maturation and differentiation» Brain Research **757** :245-253.

Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K. et Price, P.J. (1993). «Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination» Journal of Neuroscience Research **35**: 567-576.

Carlson, D.J. Strait, K.A. Schwartz, H.L. et Oppenheimer, J.H. (1997). “ Thyroid hormone receptors isoform content in cultured type 1 and type 2 astrocytes” Endocrinology **137**: 911-917.

Chan, S. et Kilby, M.D. (2000). «Thyroid hormone and central nervous system development» Journal of Endocrinology **165**: 1-8.

Clark, P., Britland, S. et Connolly, P. (1993). «Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminine surfaces» Journal of Cell Science **105**: 203-212.

Couchie, D., Faivre-Bauman, A., Puymirat, J., Guilleminot, J., Tixier-Vidal, A. et Nunez, J. (1986). «Expression of microtubule-associated proteins during the early stages of neurite extension by brain neurons cultured in a defined medium» Journal of Neurochemistry **47**: 1255-1261.

Davis, P.J. et Davis, F.B. (1996). «Nongenomic actions of thyroid hormone» Thyroid **6(5)** : 497-504.

Davis, P.J., Shih, A., Lin, H.-Y., Martino, L.J. et Davis, F.B. (2000). «Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR» Journal of Biological Chemistry **275(48)**: 38032-38039.

Dent, E.K. et Meiri, K.F. (1998). «Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior» Journal of Neurobiology **35**: 287-299.

Denver, R.J., Ouellet, L., Furling, D., Kobayashi, A., Fujii-Kuriyama, Y. et Puymirat, J. (1999). «Basic transcription element-binding protein (BTEB) is a thyroid hormone-regulated gene in the developing central nervous system» Journal of Biological Chemistry **274(33)**: 23128-23134.

Dokas, L.A., Pisano, M.R. et Han, Y.-F. (1991). «Selective phosphorylation and dephosphorylation of the protein B-50» Progress in Brain Research **89**: 27-36.

Faivre-Sarrailh, C. et Rabie, A. (1988). «A lower proportion of filamentous to monomeric actin in the developing cerebellum of thyroid-deficient rats» Brain Res **469**: 293-297.

Farwell, A.P. et Dubord-Tomasetti, S.A. (1999). «Thyroid hormone regulates the extracellular organization of laminin on astrocytes» Endocrinology **140**: 5014-5021.

Farwell, A.P. et Dubord-Tomasetti, S.A. 1999b. «Thyroid Hormone Regulates the Expression of Laminin in the Developing Rat Cerebellum» Endocrinology **140**: 4221-4227.

Farwell, A.P. et Leonard, J.L. (1997). «Extranuclear actions of thyroid hormone in the brain» dans *Recent Research Developments in Neuroendocrinology – Thyroid Hormone and Brain Maturation*. Édition Hendrich CE. Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 113-130.

Farwell, A.P., Tranter, M.P. et Leonard, J.L. (1995). «Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes» Endocrinology **136**(9): 3909-3915.

Figueiredo, B.C., Almazan, G., Ma, Y., Tetzlaff, W., Miller, F.D. et Cuello, A.C. (1993). «Gene expression in the developing cerebellum during perinatal hypo- and hyperthyroidism» Molecular Brain Research **17**: 258-268.

Filipcik, P., Saito, H. et Katsuki, H. (1994). «3,5,3'-L-Triiodothyronine promotes survival and axon elongation of embryonic rat septal neurons» Brain Research **647**:148-152.

Francon, J., Fellous, A., Lennon, A.-M. et Nunez, J. (1997). «Is thyroxine a regulatory signal for microtubule assembly during brain development?» Nature **266**: 188-190.

Garza, R., Puymirat, J. et Dussault, J.H. (1990). «Immunocytochemical localization of thyroid hormone nuclear receptors in cultured acetylcholinesterase-positive neurons : a correlation between the presence of thyroid hormone nuclear receptors and L-triiodothyronine morphological effects» Neuroscience **36**(2): 473-482.

Gerendasy, D.D. et Sutcliff, J.G. (1997). «RC3/Neurogranin, a postsynaptic calpacitin for setting the response threshold to calcium influxes» Molecular Neurobiology 15(2): 131-163.

Gharami, K. et Das, S. (2000). «Thyroid hormone-induced morphological differentiation and maturation of astrocytes are mediated through the β -adrenergic receptor» Journal of Neurochemistry 75: 1962-1969.

Giguère, A., Fortier, S., Beaudry, C., Gallo-Payet, N. et Bellabarba, D. (1996). «Effect of thyroid hormones on G protein in synaptosomes of chick embryo» Endocrinology 137 : 2558-2564.

Giguère, A., Lehoux, J.-G., Gallo-Payet, N. et Bellabarba, D. (1992). «3,5,3'-triiodothyronine binding sites in synaptosomes from brain of chick embryo. properties and ontogeny» Developmental Brain Research 66: 221-227.

Gomes, F.C.A., Lima, F.R.S., Trentin, A.G. et Moura Neto, V. (2001). «Thyroid hormone role in nervous system morphogenesis» Progress in Brain Research 132: 41-50.

Gordon-Weeks, P.R. (1991). «Control of microtubule assembly in growth cones» Journal of Cell Science, Supplement 15: 45-49.

Greenspan, F.S. (2001). «Basic and clinical endocrinology». Sixth edition, Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut.

Greis, C. et Rosner, H. (1990). «Migration and aggregation of embryonic chicken neurons in vitro : possible functional implication of polysialogangliosides» Developmental Brain Research 57: 223-234.

He, Q., Dent, E.W. et Meiri, K.F. (1997). «Modulation of actine filament behavior by GAP-43 (neuromoduline) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site» Journal of Neuroscience 17(10): 3515-3524.

Heemskerk, F.M.J., Schrama, L.H., Ghijsen, W.E.J.M., De Graan, P.N.E., Lopes da Silva, F.H. et Gispen, W.H. (1991). «Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free Ca^{2+} concentration and its relationship to B-50 (GAP-43)phosphorylation» Journal of Neurochemistry 56: 1827-1835.

Heisenberg, C.P., Thoenen, H. et Lindholm, D. (1992). «Tri-iodothyronine regulates survival and differentiation of rat cerebellar granule neurons» Neuroreport 3: 685-688.

Huang, C.-J., Geller, H.M., Green, W.L. et Craelius, W. (1999). «Acute effects of thyroid hormone analogs on sodium currents in neonatal rat myocytes» J Mol Cell Cardiol **31**:881-893.

Iniguez, M.A., Rodriguez-Pena, A., Ibarrola, N. Aguilera, M., Munoz, A. et Bernal, J. (1993). «Thyroid hormone regulation of RC3, a brain-specific gene encoding a protein kinase-C substrate» Endocrinology **133**(2): 467-473.

Koibuchi, N. et Chin, W.W. (2000). «Thyroid hormone action and brain development» Trends Endocrinol. Metab. **11**(4): 123-128.

Laferrière, N.B., MacRae, T.H. et Brown, D.L. (1997). «Tubulin synthesis and assembly in differentiating neurons» Biochem Cell Biol. **75**: 103-117.

Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A. et Goglia, F. (1994). «Rapid stimulation of rat liver cytochrome oxidase activity by 3,5-diiodo-L-thyronine and 3,3'-diiodo-thyronine» Mol Cell Endocrinol **99**: 89-94.

Lebel, J.-M., Dussault, J.H. et Puymirat, J. (1994) «Overexpression of the $\beta 1$ thyroid receptor induces differentiation in Neuro-2a cells» Proc. Natl. Acad. Sci. **91**: 2644-2648

Leonard, J.L., Farwell, A.P. (1997). «Thyroid hormone-regulated actin polymerisation in brain» Thyroid 7(1): 147-151.

Leonard, J.L., Farwell, A.P., Yen, P.M. Chin, W.W. et Stula, M. (1994). «Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms in neurons and astroglial cells.» Endocrinology 135(2): 548-555.

Lin, H.-Y., Davis, F.B., Gordinier, J.K., Martino, L.J. et Davis, P.J. (1999). «Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells» Am J Physiol. 276 : C1014-C1024.

Lin, H.-Y., Thacore, H.R., Davis, F.B., Davis, P.J. (1996). «Potentiation by thyroxine of interferon- γ -induced antiviral state requires PKA and PKC activities» Am J Physiol. 271: C1256-C1261.

Mahalik, T.J., Carrier, A., Owens, G.P. et Clayton, G. (1992). «The expression of GAP-43 mRNA during the late embryonic and early postnatal development of the CNS of the rat: an in situ hybridization study» Developmental Brain Research 67: 75-83.

Meiri, K.F. et Gordon-Weeks, P.R. (1990). «GAP-43 in growth cones is associated with areas of membrane that are tightly bound to substrate and is a component of a membrane skeleton subcellular fraction» Journal of Neuroscience 10(1): 256-266.

Meiri, K.F., Hammang, J.P., Dent, E.W. et Baetge, E.E. (1996). «Mutagenesis of ser⁴¹ to ala Inhibits the association of GAP-43 with the membrane skeleton of GAP-43-deficient PC12B cells: effects on cell adhesion and the composition of neurite cytoskeleton and membrane» Journal of Neurobiology 29(2): 213-232.

Moss, D.J., Fernyhough, P., Chapman, K., Baizer, L., Bray, D. et Allsopp, T. (1990). «Chicken growth-associated protein GAP-43 is tightly bound to the actin-rich neuronal membrane skeleton» Journal of Neurochemistry 54: 729-736.

Munoz, A. et Bernal, J. (1997) « Biological activities of thyroid hormone receptors » European Journal of Endocrinology 137: 433-445.

Munoz, A., Rodriguez-Pena, A., Perez-Castillo, A., Ferreiro, B., Gregor Sutcliffe, J. et Bernal, J. (1991). «Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression» Molecular Endocrinology 5: 273-280.

Norden, J.J., Lettes, A., Costello, B., Lin, L.-H., Wouters, B., Bock, S. et Freeman, J.A. (1991). «Possible role of GAP-43 in calcium regulation/neurotransmitter release» Ann. N.Y. Acad. Sci. **627**: 75-93.

Nunez, J., Couchie, D., Aniello, F. et Bridoux, A.M. (1991). «Regulation by thyroid hormone of microtubule assembly and neuronal differentiation» Neurochemical Research **16**(9): 975-982.

Nunez, J., Couchie, D., Aniello, F. et Bridoux, A.M. (1992). «Thyroid hormone effects on neuronal differentiation during brain development» Acta Med Austriaca **19**: 36-39.

Oppenheimer, J.H. et Schwartz, H.L. (1997). «Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development» Endocrine Reviews **18**(4): 462-475.

Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L. et Surks, M.I. (1974). «Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis.» Endocrinology **95**: 897-903.

Pallud, S., Ramaugé, M., Gavaret, J.-M., Lennon, A.-M., Munsch, N., St-Germain, D. L., Pierre, M. et Courtin, F. (1999). «Regulation of type 3 iodothyronine deiodinase

expression in cultured rat astrocytes : role of the Erk cascade» Endocrinology **140** : 2917-2923.

Pascual, A. Aranda, A. Ferret-Sena, V. Gabellec, M.M. Rebel, G. et Sarliève, L.L. (1986). «Triiodothyronine receptors in developing mouse neuronal and glial cell cultures and in chick-cultured neurones and astrocytes» Dev. Neurosci. **8**: 89-101.

Paul, S., Das, S. et Sarkar, P.K. (1992). «Effects of hypothyroidism on different forms of actin in rat cerebral neuronal cultures studied by an improved Dnase I inhibition assay» Journal of Neurochemistry **59**: 701-707.

Phillips, D.R., Jennings, L.K. et Edwards, H.H. (1980). «Identification of membrane proteins mediating the interaction of human platelets» J. Cell Biol. **86**: 77-86.

Prati, M., Calvo, R. et Morreale de Escobar, G. (1992). «L-thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine concentration in the chicken egg and in the embryo before and after the onset of thyroid function» Endocrinology **130**: 2651-2659.

Role, L.W. et Fischbach, G.D. (1987). «Changes in the number of chick ciliary ganglion neuron process with time in cell cultures» Journal of Cell biology **104**: 363-370.

Rosner, H. et Vacun, G. (1999). «1,2-Dioctanoyl-s,n-glycerol-induced activation of protein kinase C results in striking, but reversible growth cone shape changes and an accumulation of f-actine and serine 41-phosphorylated GAP-43 in the axonal process» European Journal of Cell Biology **78**: 698-706.

Roussel, J.P, Grazzini, E. Zumbihl, R., Rodriguez, E. et Astier, H. (1995). «Triiodo-L-thyronine enhances TRH-induced TSH release from perifused rat pituitaries and intracellular Ca^{2+} levels from dispersed pituitary cells» Eur. J. Pharmacol. **289**(2): 205-15.

Rudinger, A., Mylotte, K.M., Davis, P.J., Davis, F.B. et Blas, S.D. (1984). «Rabbit myocardial membrane Ca^{2+} -ATPase activity stimulation in vitro by thyroid hormone» Arch Biochem Biophys **229**: 379-385.

Samuels, H.H., Stanley, F. et Casanova, J. (1979). «Depletion of L-3,5,3'-triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell cultures studies of the action of thyroid hormone» Endocrinology **105**: 80-85.

Savettieri, G., Licata, L., Catania, C., Raneri, R., Di Liegro, I. et Cestelli, A. (1999). «Synergistic effects of laminin and thyroid hormones on neuron polarity in culture» NeuroReport **10**: 1269-1272.

Segal, J. (1990). «In vivo effect of 3,5,3'-triiodothyronine on calcium uptake in several tissues in the rat: evidence for a physiological role for calcium as the first messenger for the prompt action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane» Endocrinology **127**(1): 17-24.

Segal, J et Ingbar, S.H. (1989). «Evidence that an increase in cytoplasmic calcium is the initiating event in certain plasma membrane-mediated responses to 3,5,3'-triiodothyronine in rat thymocytes» Endocrinology **124**(4): 1949-55.

Sheu, F.-S., Marais, R.M., Parker, P.J., Bazan, N.G. et Routtenberg, A. (1990). «Neuron-specific protein F1/GAP-43 shows substrate specificity for the beta subtype of protein kinase C» Biochemical and Biophysical Research Communications **171**(3): 1236-1243.

Siegrist-Kaiser, C.A., Juge-Aubry, C., Tranter, M.P., Ekenbarger, D.M. et Leonard, J.L. (1990). «Thyroxine-dependent modulation of actin polymerisation in cultured astrocytes» Journal of Biological Chemistry **265**(9): 5296-5302.

Silva, J.E. et Rudas, P. (1990). «Effects of congenital hypothyroidism on microtubule-associated protein-2 expression in the cerebellum of the rat» Endocrinology **126**(2): 1276-1282.

Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W. et Liao, J.K. (2000). «Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase» Nature **407**: 538-541.

Solomon, F. (1986). «Direct identification of microtubule-associated proteins by selective extraction of cultured cells» Methods in enzymology **134**: 139-147.

Sterling, K. (1986). «Direct thyroid hormone activation of mitochondria: the role of adenine nucleotide translocase» Endocrinology **119**: 292-295.

Strittmatter, S.M., Igarashi, M. et Fishman, M.C. (1994). «GAP-43 Amino terminal peptides modulate growth cone morphology and neurite outgrowth» Journal of Neuroscience **14**(9) : 5503-5513.

Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., Kennedy, T.E., Neer, E.J. et Fishman, M.C. (1990). «Go is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43» Nature **344**: 836-841.

Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., Vartanian, T., Sudo, Y., Zuber, M.X. et Fishman, M.C. (1991). «Growth cone transduction : Go and GAP-43» Journal of Cell Science, Supplement **15**:27-33.

Sun, Z-Q., Ojamaa, K., Coetzee, W.A., Artman, M. et Klein, I. (2000). «Effects of thyroid hormone on action potential and repolarizing currents in rat ventricular myocytes» Am J Physiol Endocrinol Metab 278(2): E302-7.

Tejero-Diez, P., Rodriguez-Sanchez, P., Martin-Cofreces, N.B. et Diez-Guerra, F.J. (2000). «bFGF stimulates GAP-43 phosphorylation at ser41 and modifies its intracellular localization in cultured hippocampal neurons» Molecular and Cellular Neuroscience 16: 766-780.

Tessier-Lavigne, M. et Goodman, C.S. (1996). «The molecular biology of axon guidance» Science 274: 1123-1132.

Tokioka, R., Matsuo, A., Kiyosue, K., Kasai, M. et Taguchi, T. (1993). «Synapse formation in dissociated cell cultures of embryonic chick cerebral neurons» Developmental Brain Research 74: 146-150.

Walker, I.B. (1996). «Triiodothyronine exerts a trophic action on rat sensory neuron survival and neurite outgrowth through different pathways» European Journal of Neuroscience 8: 455-466.

Warnick, P.R., Davis, P.J., Davis, F.B., Cody, V., Galindo, J. Jr et Blas, S.D. (1993). «Rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone analogues and bipyridines» Biochim Biophys Acta **1153**: 184-190.

Widmer, F. et Caroni, P. (1993). «Phosphorylation-site mutagenesis of the growth-associated protein GAP-43 modulates its effects on cell Spreading and morphology» Journal of Cell Biology **120**(2): 503-512.

Yen, P.M. (2001). «Physiological and molecular basis of thyroid hormone action» Physiological Reviews **81**(3): 1097-1142.

Zhang, J. et Lazar, M.A. (2000). «The mechanism of action of thyroid hormones» Annu. Rev. Physiol. **62**: 439-66.